

Aus der Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie

Universitätsklinikum des Saarlandes

(Direktor: Univ.-Professor Dr. Thomas Volk)

**Rolle einer Melatoninrezeptoraktivierung für die hepatische
Mikrozirkulation nach polymikrobieller Sepsis in der Maus**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2016

vorgelegt von

Maria Teresa Schornberg

geboren am 28.12.1985

in Siegen

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
1 ZUSAMMENFASSUNG	6
2 SUMMARY	8
3 EINLEITUNG	10
3.1 Sepsis.....	10
3.1.1 Bedeutung und Definition der Sepsis	10
3.1.2 Epidemiologie und Prognose der Sepsis	12
3.1.3 Pathophysiologie der Sepsis	13
3.1.4 Therapie der Sepsis	18
3.2 Melatonin	21
3.2.1 Physiologie.....	21
3.2.2 Melatoninrezeptoren	23
3.2.3 Protektive Eigenschaften von Melatonin	28
3.2.4 Protektive Mechanismen von Melatonin	31
3.3 Ziel der Studie	34
4 MATERIAL UND METHODEN.....	36
4.1 Material	36
4.1.1 Versuchstiere.....	36
4.1.2 Medikamente und Chemikalien	36
4.2 Methodik	37
4.2.1 CLI-Sepsismodell	37
4.2.2 Narkose	37

4.2.3	Chirurgisches Vorgehen.....	37
4.2.4	Versuchstiergruppen	39
4.2.5	Messung der Vitalparameter	41
4.2.6	Fluoreszenzmarkierung der Erythrozyten.....	41
4.2.7	Intravitalmikroskopie	41
4.2.8	Intravitalmikroskopische Auswertung	43
4.2.9	Statistische Auswertung.....	44
5	ERGEBNISSE	45
5.1	Vitalparameter	45
5.2	Sinusoidale Perfusion.....	46
5.2.1	Erythrozytengeschwindigkeit	48
5.2.2	Volumetrischer Blutfluss	49
5.2.3	Hepatischer Perfusionsindex.....	50
5.3	Zellschaden.....	53
5.3.1	PI-positive Zellen.....	53
6	DISKUSSION.....	55
6.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	55
6.2	Hämodynamik	55
6.3	Mikrozirkulation.....	56
6.3.1	Einfluss der Sepsis auf die Mikrozirkulation.....	56
6.3.2	Einfluss der Melatoninrezeptoraktivierung auf die Mikrozirkulation	58
6.4	Zellschaden.....	61
6.4.1	Einfluss der Sepsis auf den Zellschaden	61
6.4.2	Einfluss von Melatonin auf den Zellschaden	61

6.5	Grenzen der Studie	63
7	LITERATURVERZEICHNIS	66
8	DANKSAGUNG	80

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
AANAT	Serotonin-N-Acetyltransferase
AC	Adenylatzyklase
ACCP	American College of Chest Physicians
AFMK	N ¹ -Acetyl-N ² -formyl-5-methoxykynuramin
AMK	N ¹ -Acetyl-5-methoxykynuramin
ANOVA	Analysis of variance, Varianzanalyse
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CASP	Colon ascendens Stent Peritonitis
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CLI	Zökum Ligatur und Inzision
CLP	Zökum Ligatur und Punktion
cm	Zentimeter
CREB	Cyclic AMP-responsive element-binding protein
D	Krankheitsdauer
dl	deziliter
DMSO	Dimethylsulfoxid
e. V.	eingetragener Verein

et al.	et alii
FiO ₂	Inspiratorische Sauerstoffkonzentration
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
G _i -Protein	inhibitorisches Guaninnucleotid-bindendes Protein
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
h	Stunde
HMGB1	High-Mobility-Group-Protein B1
I	Inzidenz
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
K ⁺	Kalium
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
kPa	Kilopascal
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
Luz	Luzindole
MAP	Mittlerer arterieller Druck
MCP	Monocyte chemotactic protein
Mel	Melatonin
Mel _{1A}	Melatoninrezeptor MT-1
Mel _{1B}	Melatoninrezeptor MT-2
mg	Milligramm

MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MIF	Macrophage Migration Inhibitory Factor
min	Minute
MIP	Macrophage Inflammatory Protein
ml	Milliliter
mm ³	Kubikmillimeter
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
mmol	Millimol
MODS	Multiple Organ Dysfunction Syndrome
mRNA	messenger ribonucleic acid, Boten-Ribonukleinsäure
MT	Melatoninrezeptor
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
nm	Nanometer
NO•	Stickstoffmonoxid
O ₂ • ⁻	Hyperoxidanion
P	Prävalenz
PaCO ₂	Partialdruck des gelösten Kohlenstoffdioxids im Plasma
PaO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PI	Propidiumiodid
PIx	hepatischer Perfusionsindex
pl	Picoliter
PLA ₂	Phospholipase A ₂

PLC	Phospholipase C
p-Wert (p)	Probability value (Signifikanzwert)
QR2	Quinonreduktase-2
QR2-/-	Quinonreduktase-2-knock-out
Ram	Ramelteon
RNS	Reaktive Stickstoffspezies
ROR	Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RZR	Retinoid Z receptor
s	Sekunde
SCCM	Society of Critical Care Medicine
SCN	Nucleus suprachiasmaticus
ScvO ₂	Zentralvenöse Sauerstoffsättigung
S _D	Sinusoidaler Durchmesser
SD	Standardabweichung
SIRS	Systemisches inflammatorisches Response-Syndrom
Sp	Perfundierte Sinusoide
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor-alpha
U	Units
VBF	Volumetric blood flow, hepatischer Blutfluss
VRBC	Erythrozytenflussgeschwindigkeit
vs.	versus
W	Watt
z. B.	zum Beispiel

ZVD Zentralvenöse Druck

β Beta

π Pi

1 ZUSAMMENFASSUNG

Die Sepsis und der septische Schock sind mit einer Inzidenz von 76 bis 85 pro 100.000 Einwohnern derzeit die dritthäufigste Todesursache in Deutschland. Trotz intensiver diagnostischer und therapeutischer Bemühungen nimmt die Letalität der Sepsis in den letzten Jahren stetig zu.

Das Krankheitsbild Sepsis ist definiert als Folge einer Infektion mit nachfolgender generalisierter Entzündungsreaktion. Pathophysiologisch kommt es während einer Sepsis zunächst zu einer hyperdynamen, gefolgt von einer hypodynamen Kreislaufreaktion. Bei einer schweren Sepsis entwickeln sich zudem Endorganschäden, die unter anderem durch Mikrozykulationsstörungen bedingt sind.

Der Leber, als zentrales Organ des gesamten Stoffwechsels, kommt während einer Sepsis eine große Bedeutung zu, da sie viele lebenswichtige Stoffwechselprozesse reguliert und dabei oft selbst durch hypoxische, mikrozykulatorische und mediatorbedingte Einflüsse geschädigt wird.

Das körpereigene Hormon Melatonin, das als Überträger der photoperiodischen Information fungiert, zeigt ausgeprägte organprotektive Eigenschaften. Diese Protektion wurde in der Vergangenheit durch das hohe antioxidative Potential von Melatonin erklärt. Aktuell mehren sich die Hinweise darauf, dass eine Aktivierung von Melatoninrezeptoren einen großen Anteil an der durch Melatonin vermittelten Organprotektion hat. In mehreren vorausgegangenen Untersuchungen konnte nach exogener Zufuhr von Melatonin sowohl eine Organprotektion nach Ischämie und Reperfusion der Leber, als auch eine Verlängerung des Überlebens nach polymikrobieller Sepsis im Tiermodell gezeigt werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, den Einfluss einer exogenen Melatoningabe während einer polymikrobiellen Sepsis auf die Mikrozykulation der Leber zu untersuchen.

Hierfür wurde bei narkotisierten, spontan atmenden männlichen C3H/HeN-Mäusen (Anzahl = 5 pro Gruppe) eine Sepsis mittels einer Zökum Ligatur und Inzision (CLI) induziert oder eine Scheinoperation durchgeführt. Die Tiere erhielten entweder Melatonin, den Melatoninrezeptoragonisten Ramelteon, den Melatoninrezeptorantagonisten Luzindole, Melatonin + Luzindole oder Ramelteon + Luzindole. 5 Stunden nach Sepsisinduktion wurde eine Intravitalmikroskopie der Leber durchgeführt und damit die Leberperfusion sowie der Leberzellschaden untersucht.

In der vorliegenden Studie zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der Mikrozirkulation in der Leber der Maus nach experimentell induzierter Sepsis im Vergleich zu scheinoperierten Tieren. Eine Melatoningabe führte sowohl bei den Sepsis-Tieren als auch bei den Kontroll-Tieren zu einer Erhöhung der Erythrozytenflussgeschwindigkeit und des volumetrischen Blutflusses in der Leber, ohne das Signifikanzniveau zu überschreiten. Diese Erhöhung der hepatischen Mikrozirkulation war nach zusätzlicher Gabe des Melatoninrezeptorantagonisten Luzindole nicht mehr nachweisbar. Der Melatoninrezeptoragonist Ramelteon führte zu keiner messbaren Veränderung der Mikrozirkulation in der Leber. 5 Stunden nach Induktion einer Sepsis zeigte sich eine Tendenz zu vermehrtem Zellschaden in der Leber unabhängig von der jeweiligen Therapie.

Die gefundenen Ergebnisse zeigten einen Trend zu einer verbesserten Mikrozirkulation der Leber nach Melatoningabe. Die Normalisierung des hepatischen Blutflusses nach Luzindolegabe könnte hierbei für einen rezeptorabhängigen Mechanismus sprechen, der sich allerdings bei dem Melatoninrezeptoragonisten Ramelteon nicht nachweisen ließ. Auf Basis der gefundenen Ergebnisse werden weitere Untersuchungen notwendig sein um einen hepatoprotektiven, unter Umständen melatoninrezeptorabhängigen Effekt, während einer Sepsis genauer zu beleuchten.

2 SUMMARY

The role of melatonin receptor activation in hepatic microcirculation after polymicrobial sepsis in mice

At present, sepsis and the septic shock are ranked as the third most frequent cause of death in Germany with an incidence of 76 to 85 per 100,000 inhabitants. Despite extensive diagnostic and therapeutic efforts, mortality of sepsis has increased in recent years.

Sepsis is defined as a generalized inflammatory response to an infection. Pathophysiology shows that during the occurrence of sepsis a hyperdynamic circulatory reaction is followed by a hypodynamic phase. Among other factors, impaired microcirculation leads to end organ damage in cases of severe sepsis.

As the central metabolic organ, the liver is of significant importance by regulating various essential metabolic processes. At the same time, the liver itself is at risk of sustaining severe damage caused by influences of hypoxia, impaired microcirculation and mediator-related effects. The endogenous hormone melatonin which acts as a submitter of photoperiodic information proves to possess organ-protective properties.

In the past, the extensive antioxidative potential of melatonin was thought to be the explanation for these organ-protective properties. Today, there is evidence that the activation of melatonin receptors is mainly responsible for those qualities. Numerous previous animal studies have shown that the exogen administration of melatonin may prolong survival in polymicrobial sepsis. Additionally, the damage induced by ischaemia and reperfusion in liver tissue was proven to be less severe after the administration of melatonin.

The goal of the present work was to examine the influence of melatonin on the microcirculation of the liver in induced polymicrobial sepsis. In sedated, spontaneously breathing male C3H/HeN mice, sepsis was induced by ligature and incision of the coecum. In the control group, pseudo-operations were performed. Those two groups were each split in different test groups where either melatonin, the melatonin receptor agonist ramelteon, the melatonin receptor antagonist lucindole, a combination of melatonin and lucindole or a combination of ramelteon and lucindole were injected intravenously. Five hours following the induction of sepsis, intravital microscopy of the liver was carried out in order to assess liver perfusion and the extent of liver tissue damage.

The results of this study showed that there were no significant changes in liver microcirculation subsequent to surgically induced sepsis compared to pseudo-operations. The administration of melatonin leads to an increased erythrocyte flow velocity in both groups without reaching a statistically significant level. After administering the melatonin receptor antagonist lucindole, this increased hepatic microcirculation could no longer be detected. The receptor agonist ramelteon had no quantifiable effect on microcirculation. Five hours after the induction of sepsis, extensive liver tissue damage was observed irrespective of therapeutic measures.

The results found in this study showed a trend towards an improved microcirculation of the liver after the administration of melatonin. Normalization of hepatic blood flow following administration of lucindole might suggest a receptor-dependent mechanism. However, this effect was not found regarding the melatonin receptor agonist ramelteon. Based on these results, further studies will be required to elucidate the hepatoprotective effect during sepsis, which under certain conditions is melatonin receptor-dependent.

3 EINLEITUNG

3.1 Sepsis

3.1.1 Bedeutung und Definition der Sepsis

Die Sepsis stellt auch in der heutigen Zeit noch ein bedeutsames medizinisches und ökonomisches Problem dar. Dies verdeutlichte 2007 eine Studie des „Kompetenznetzes Sepsis“, in der die Prognose der Sepsis anhand der Krankenhaussterblichkeit in Deutschland untersucht wurde. Hierbei zeigte sich trotz moderner medizinischer Maßnahmen für die schwere Sepsis eine sehr hohe Sterblichkeit von 55 % (ENGEL et al., 2007).

Um die Studienlage zur Prognose der Sepsis zu verstehen, werden im Folgenden zunächst einige grundlegende Begriffe erklärt:

Die Sepsis wird definiert als eine systemische inflammatorische Reaktion des Wirtsorganismus auf eine Infektion. 1992 wurden durch das Komitee der American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference (ACCP/SCCM Konsensus-Konferenz) die Diagnosekriterien der Sepsis aufgestellt und zudem die Begriffe „Schwere Sepsis“, „Septischer Schock“, „SIRS“ (Systemic Inflammatory Response Syndrome) und „MODS“ (Multiple Organ Dysfunction Syndrome) definiert (siehe

Tabelle 1) (BONE, 1992).

Unter einem MODS versteht man das Vorhandensein veränderter Organfunktion bei Akutkranken, welches zur Aufrechterhaltung einer Homöostase eine Intervention erfordert (BONE, 1992).

Tabelle 1: Diagnosekriterien für Sepsis, schwere Sepsis und septischen Schock (aus 1. Revision der S-2k Leitlinien der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e. V. und der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (REINHART et al., 2010)) entsprechend der ACCP/SCCM Konsensus-Konferenz Kriterien (BONE, 1992)

I. Nachweis der Infektion

Diagnose einer Infektion über den mikrobiologischen Nachweis oder durch klinische Kriterien

II. Systemic inflammatory host response syndrome (SIRS) (mindestens 2 Kriterien)

- Fieber ($\geq 38\text{ °C}$) oder Hypothermie ($\leq 36\text{ °C}$) bestätigt durch eine rektale, intravasale oder vesikale Messung
- Tachykardie: Herzfrequenz $\geq 90/\text{min}$
- Tachypnoe (Frequenz $\geq 20/\text{min}$) oder Hyperventilation ($\text{PaCO}_2 \leq 4.3\text{ kPa}$ bzw. $\leq 33\text{ mmHg}$)
- Leukozytose ($\geq 12\ 000/\text{mm}^3$) oder Leukopenie ($\leq 4\ 000/\text{mm}^3$) oder $\geq 10\%$ unreife Neutrophile im Differentialblutbild

III. Akute Organdysfunktion (mindestens 1 Kriterium)

- Akute Enzephalopathie: eingeschränkte Vigilanz, Desorientiertheit, Unruhe, Delirium.
- Relative oder absolute Thrombozytopenie: Abfall der Thrombozyten um mehr als 30 % innerhalb von 24 h oder Thrombozytenzahl $\leq 100\ 000/\text{mm}^3$. Eine Thrombozytopenie durch akute Blutung oder immunologische Ursachen muss ausgeschlossen sein.
- Arterielle Hypoxämie: $\text{PaO}_2 \leq 10\text{ kPa}$ ($\leq 75\text{ mmHg}$) unter Raumluft oder ein $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ -Verhältnis von $\leq 33\text{ kPa}$ ($\leq 250\text{ mmHg}$) unter Sauerstoffapplikation. Eine manifeste Herz- oder Lungenerkrankung muss als Ursache der Hypoxämie ausgeschlossen sein.
- Renale Dysfunktion: Eine Diurese von $\leq 0.5\text{ ml/kg/h}$ für wenigstens 2 h trotz ausreichender Volumensubstitution und/oder ein Anstieg des Serumkreatinins $> 2 \times$ oberhalb des lokal üblichen Referenzbereiches.
- Metabolische Azidose: Base Excess $\leq -5\text{ mmol/l}$ oder eine Laktatkonzentration $> 1,5 \times$ oberhalb des lokal üblichen Referenzbereiches.

Sepsis: Kriterien I und II,

Schwere Sepsis: Kriterien I, II und III

Septischer Schock: Kriterien I und II sowie für wenigstens 1 h ein systolischer arterieller Blutdruck $\leq 90\text{ mmHg}$ bzw. ein mittlerer arterieller Blutdruck $\leq 65\text{ mmHg}$ oder notwendiger Vasopressoreinsatz, um den systolischen arteriellen Blutdruck $\geq 90\text{ mmHg}$ oder den arteriellen Mitteldruck $\geq 65\text{ mmHg}$ zu halten. Die Hypotonie besteht trotz adäquater Volumengabe und ist nicht durch andere Ursachen zu erklären.

3.1.2 Epidemiologie und Prognose der Sepsis

Nicht nur bezüglich der Letalität sondern auch in Betrachtung der Prävalenz ist die Sepsis ein wichtiges Krankheitsbild.

In Deutschland wurde die Epidemiologie der Sepsis in einer großen nationalen prospektiven multizentrischen Studie von dem „Kompetenznetz Sepsis“ untersucht (ENGEL et al., 2007). Nach dieser Studie ist die Prävalenz der Sepsis und der schweren Sepsis auf deutschen Intensivstationen 12,4 % bzw. 11,0 %. Die Inzidenz (I) der Sepsis wurde nicht direkt gemessen, wurde aber durch Berechnung aus Prävalenz (P) und mittlere Krankheitsdauer (D) ermittelt: $P/(1 - P) = I * D$. Aus dieser Berechnung ergeben sich unter Einbeziehung der aktuellen totalen Erwachsenenpopulation von 68.000.000 in Deutschland eine Inzidenz von 85 Fällen für die Sepsis und 76 Fällen für die schwere Sepsis pro 100.000 Einwohner, bzw. 116 und 110 Fälle pro 100.000 Einwohner, wenn man der Berechnung eine kürzere Krankheitsdauer von 9,2 Tagen und 8,5 Tagen statt der Liegedauer auf Intensivstation von 12,6 bzw. 12,3 Tagen zugrunde legt.

Eine Auswertung der Daten, die bei der Studie der „Surviving Sepsis campaign“ (LEVY et al., 2010) erhoben wurden, zeigt eine Krankenhausmortalität von 32 % (LEVY et al., 2012). Allerdings gibt es große Unterschiede in der Krankenhausmortalität in Europa im Vergleich zur USA (41 % vs. 28,3 %).

Bezüglich des Organversagens treten laut „Surviving Sepsis campaign“ in den USA signifikant mehr Ein-Organversagen und in Europa mehr Multi-Organversagen auf.

Betroffene Organsysteme im Rahmen eines Multi- oder Ein-Organversagens in der Sepsis beinhalten das kardiovaskuläre- und das hämatologische System, die Lunge, die Niere und die Leber, zudem kommt es zum Auftreten von akuter Enzephalopathie sowie metabolischer Azidose (ENGEL et al., 2007; LEVY et al., 2012). Innerhalb des Organversagens gibt es eine zeitliche Reihenfolge, wobei die Leber als zweites Organ nach der Lunge ausfällt und ihr somit eine bedeutende Rolle zukommt (FRY et al., 1980). Verdeutlicht wird der große Stellenwert der Leber in der Sepsis auch durch die Studie von Kramer et al., die zeigen konnten, dass eine frühe Leberfunktionsstörung bei kritisch kranken Patienten einen wichtigen Risikofaktor für eine schlechte Prognose darstellt (KRAMER et al., 2007).

3.1.3 Pathophysiologie der Sepsis

3.1.3.1 Auslöser

Die Sepsis besteht aus einer inflammatorischen Reaktion auf eine Infektion. Die Infektion kann sowohl bakteriell, viral als auch durch Pilze bedingt sein. Von einem „Sepsisherd“ ausgehend (lokale Infektion) kommt es zu einer Einschwemmung der Erreger in die Blutbahn, entsprechend einer Bakteriämie, Virämie oder Fungämie. Früher waren die Hauptursache der Sepsis gramnegative Bakterien. In den letzten drei Jahrzehnten ist der Anteil der grampositiven Bakterien gestiegen, sodass sie inzwischen die Hälfte der Sepsiserreger darstellen. Zudem zeigt sich eine zunehmende Inzidenz der Pilzsepsis (BOCHUD, CALANDRA, 2003). Allerdings ist in 30 % kein mikrobiologisch gesicherter Nachweis einer Infektion möglich, auch wenn diese nach klinischen Kriterien wahrscheinlich ist (REINHART et al., 2010).

3.1.3.2 Aktivierung des Immunsystems

Durch bestimmte Strukturen der Erreger, den sogenannten Pathogen-associated Molecular Patterns, kommt es über deren Bindung an Pattern-Recognition Receptors myeloischer Zellen zur Aktivierung des unspezifischen Immunsystems (COHEN, 2002; BOCHUD, CALANDRA, 2003).

Zudem kann eine Aktivierung des Immunsystems durch die Bindung von Superantigenen, welche von grampositiven Erregern sezerniert werden, ausgelöst werden. Diese binden an den β -Anteil des T-Zell-Rezeptors und an den MHC-Klasse-II-Komplex antigenpräsentierender Zellen. Dies führt zu einer massiven T-Zell-Aktivierung und Ausschüttung proinflammatorischer Lymphokine.

Werden die Pattern-Recognition Receptors stimuliert, kommt es über intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden zu einer Aktivierung nukleärer Transkriptionsfaktoren. Ein wichtiger dieser Transkriptionsfaktoren ist der NF- κ B, welcher die Genexpression multipler Zytokine, z. B. Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- α) und das Interleukin-6 (IL-6), reguliert.

Nach Ausschüttung früher Mediatoren, z. B. die von Monozyten sezernierten Zytokine (siehe Tabelle 2) und andere pro- und antiinflammatorischer Zytokine, kommt es zur Freisetzung sekundärer Mediatoren, welche die direkte Schädigung der Zellen und somit auch der wirtseigenen Zellen verursachen. Zu diesen Mediatoren zählen reaktive Sauerstoffspezies (ROS), Stickstoffmonoxid (NO \bullet), Kohlenmonoxid, Derivate der Arachidonsäure

(Eikosanoide, Leukotriene), Plättchenaktivierender Faktor, Proteasen und Komplementsystem (siehe Tabelle 2).

So kann die Aktivierung des Immunsystems und die Freisetzung von Mediatoren im Verlauf einer Sepsis zu Organdysfunktion führen, auf die im folgenden Abschnitt näher eingegangen wird.

Tabelle 2: Produkte von Makrophagen, welche in die Pathogenese der Sepsis involviert sind (modifiziert nach Cohen 2002 (COHEN, 2002))

Mediatoren	Typischer Effekt
Zytokine IL-1, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18, TNF- α , MIF, HMGB1, IL-10	Aktiviert Neutrophile Granulozyten, Lymphozyten und Gefäßendothel; Hochregulierung zellulärer Adhäsionsmoleküle, Induktion von Prostaglandinen, Stickoxidsynthese und Akute-Phase-Proteinen; Fieberinduktion. IL-10 ist überwiegend ein negativer Regulator dieser Effekte
Chemokine IL-8, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, MCP-3	Mobilisierung und Aktivierung inflammatorischer Zellen, vor allem Neutrophiler Granulozyten; Aktivierung von Makrophagen
Lipidmediatoren Plättchenaktivierender Faktor, Prostaglandine Leukotriene, Thromboxan, Tissue factor	Aktivierung des Gefäßendothels; Regulation des Gefäßtonus,; Aktivierung der Extrinsischen Gerinnungskaskade
Sauerstoffradikale Hyperoxid- und Hydroxylradikale, Stickoxid	Antimikrobielle Eigenschaften; Regulierung des Gefäßtonus

3.1.3.3 Pathogenese der Organdysfunktion

Im Rahmen der Sepsis kann es zu Organdysfunktionen kommen. Die Maximalform der Organdysfunktion entspricht dem MODS. Ursachen dieser Dysfunktion sind vielseitig und komplex. Zu ihnen zählen die (a.) Zirkulationsstörung und verminderte Sauerstoffversorgung, (b.) Sauerstoffutilisationsstörung, (c.) Apoptose, (d.) endokrine Funktionsstörung.

- Zirkulationsstörung und Sauerstoffversorgung

Bei der Sepsis kommt es durch Mediatoren, wie dem NO•, zu einer Vasodilatation und einer endothelialen Dysfunktion mit Ödembildung. Die Vasodilatation führt zu einem verminderten peripheren Widerstand und Hypotension. Kompensatorisch kommt es zunächst zu einer vermehrten Pumpleistung des Herzens, mit erhöhtem Herzzeitvolumen, entsprechend einer

hyperdynamen Phase der Sepsis. Allerdings ist dieser Kompensationsversuch bezogen auf den peripheren Widerstand trotz alledem inadäquat. Im weiteren Verlauf kann es zu einer septischen Kardiomyopathie kommen, welche in einer Makrozirkulationsstörung mündet. Durch adäquate Volumensubstitution kann die hyperdynamische Phase während der Sepsis meist aufrechterhalten werden ((BAUER et al., 2006).

Auf mikrozirkulatorischer Ebene kommt es ebenfalls zu Störungen. Hierfür verantwortlich sind sowohl Faktoren der Inflammation als auch der Gerinnung. Zu diesen zählen Fibrinablagerungen, verminderte Verformbarkeit von sowohl Erythrozyten als auch Leukozyten, die vermehrte Adhäsion von Leukozyten, endotheliale Schwellung und verminderte Blutflussgeschwindigkeit. So bilden sich Mikrothromben in den kleinen Gefäßen, was zu einer lokalen Ischämie führt. Neben diesen thrombosierten Gefäßen gibt es offene Gefäße, durch die das Blut mit einer erhöhten Geschwindigkeit fließt. Über diese Kapillaren mit hoher Blutflussgeschwindigkeit kann es zu einem funktionellen Shunting kommen. Die Mikrozirkulationsstörung während der Sepsis ist also insofern gestört, dass es keine adäquate Regulation zwischen Sauerstoffbedarf und Sauerstoffversorgung gibt (BATEMAN et al., 2003).

- Sauerstoffutilisation

Der Sauerstoffverbrauch in der Sepsis ist ebenfalls gestört. So kann zum einen der Sauerstoff aufgrund des perivaskulären Ödems nur erschwert zu den Zielzellen diffundieren. Zum anderen ist aufgrund von Mitochondrienschädigung und -dysfunktion die Atmungskette gestört und Sauerstoffverbrauch und -verwendung eingeschränkt (ZELL et al., 1997).

Die Makro- und Mikrozirkulationsstörungen und die verminderte Sauerstoffutilisation führen zusammen zu einer hypoxischen Schädigung des Gewebes. Diese kann sich sowohl in Form von Zellnekrosen als auch Zellapoptosen manifestieren.

- Apoptose

Ein weiterer Faktor, welcher zur Organdysfunktion beiträgt, ist der programmierte Zelltod, die Apoptose, welche durch einen extrinsischen und einen intrinsischen Signalweg ausgelöst werden kann. (RUSSELL et al., 2011).

In der Sepsis kommt es zu einer vermehrten Apoptose von Lymphozyten (HOTCHKISS et al., 1997), dendritischen Zellen (HOTCHKISS et al., 2002), Alveolar- und respiratorischen Endothelzellen (HOTCHKISS et al., 1997), Kapillarendothelzellen (HOTCHKISS et al., 1997), Epithelzellen des Ileums und Colons (HOTCHKISS et al., 1997) und

Skelettmuskelzellen (HOTCHKISS et al., 1997). Für neutrophile Granulozyten konnte dagegen eine verminderte Apoptose in der Sepsis nachgewiesen werden (KEEL et al., 1997).

- Endokrine Funktionsstörung in der Sepsis

Die endokrine Funktionsstörung in der Sepsis betrifft unterschiedliche hormonelle Systeme. Ein Beispiel ist die Störung der Hypophysen-Hypothalamus-Nebennierenrinden-Achse entsprechend einer relativen Nebenniereninsuffizienz (ANNANE et al., 2002).

- Autonome Dysregulation

In der Sepsis ist das Zusammenspiel von Sympathikus und Parasympathikus gestört. Durch eine verminderte Chemo- und Baroreflexsensitivität kommt es zu einer pathologischen Herzfrequenzvariabilität und dadurch verminderten Steuerbarkeit der Organperfusion. (SCHMIDT et al., 2001).

3.1.3.4 Die Leber in der Sepsis

Die Leber spielt in der Sepsis eine wichtige Rolle. Zum einen, weil sie viele Stoffwechselwege, die Gerinnung und auch die inflammatorische Reaktion reguliert, zum anderen, weil sie selber durch hypoxische, aber auch durch mediatorbedingte Einflüsse geschädigt wird.

Die vielseitigen Aufgaben der Leber und die pathophysiologischen Vorgänge in der Sepsis können teilweise einzelnen Zelltypen zugeordnet werden:

(a.) Kupffer-Zellen

Ein großer Anteil der Makrophagen des Körpers (circa 80 %) findet sich in der Leber in Form von Kupffer-Zellen (STRASSBURG, 2003). Ihre Aufgabe besteht unter anderem darin, Bakterien (KATZ et al., 1991) und Endotoxin (MATHISON, ULEVITCH, 1979) aus dem portalvenösen Blut zu eliminieren. Die Kupffer-Zellen nehmen durch unterschiedliche Mechanismen Einfluss auf die systemische Konzentration zirkulierender Zytokine. Zum einen werden im Rahmen der Sepsis hepatische Makrophagen zur Produktion inflammatorischer und antiinflammatorischer Zytokine angeregt, wie z. B. TNF- α (FONG et al., 1990). Andererseits werden Zytokine, wie TNF- α (FERRAILOLO et al., 1988) und IL-1 β (KLAPPROTH et al., 1989), aus dem portalvenösen Blut eliminiert um einem Übermaß zirkulierender Zytokine entgegenzuwirken. Insgesamt hat die Leber somit einen hemmenden Einfluss auf das Eindringen bakterieller Bestandteile und Zytokine aus der intestinalen

Zirkulation in die systemische Zirkulation und kann dadurch zu einer Abschwächung der systemischen inflammatorischen Reaktion führen.

(b.) Hepatozyten

In der Sepsis kommt es zu einer erhöhten Produktion von Akute-Phase-Proteinen in den Hepatozyten (DARLINGTON et al., 1986) und somit zu einer Beeinflussung der inflammatorischen Reaktion.

Der Glukosestoffwechsel ist insofern verändert, dass in der ersten Phase der Sepsis die Glykogenolyse und die Gluconeogenese gesteigert sind. Dies kann im Verlauf aufgrund der Inhibition des limitierenden Enzyms Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase durch Endotoxin nicht beibehalten werden, sodass im späten septischen Schock die Gluconeogenese vermindert ist (HILL, MCCALLUM, 1991).

In den Hepatozyten findet die Biotransformation unter anderem über das Cytochrom P450-System statt, welches in der Sepsis eine verminderte Funktion aufweist (ABDEL-RAZZAK et al., 1993; MULLER et al., 1996). Zusätzlich dazu ist der hepatobiliäre Transport (ROELOFSEN et al., 1994) und Gallefluss vermindert mit einer daraus resultierenden Cholestase (ROONEY et al., 1971; FAN et al., 2013). Dies zusammengenommen führt insgesamt zu einer verminderten Entgiftungsleistung der Leber.

(c.) Endothelzellen

Endothelzellen scheinen ebenfalls über die Produktion von IL-1 und IL-6 (FEDER et al., 1993) oder von Hyperoxidationen (BAUTISTA et al., 1990) einen Einfluss auf die inflammatorische Reaktion zu besitzen.

Durch Endotoxin kommt es zu einer verminderten Durchlässigkeit des hepatischen sinusoidalen Endothels aufgrund reduzierter Porengröße und -anzahl (DOBBS et al., 1994). Es wird postuliert, dass diese verminderte Durchlässigkeit zwischen Blut und Dissé-Raum ein pathogenetischer Faktor in der Entstehung der in der Sepsis beobachteten Hyperlipidämie ist (CHELUVAPPA et al., 2009).

(d.) Neutrophile Granulozyten

Die Extravasation neutrophiler Granulozyten und deren Einwanderung in umliegendes Gewebe ist ein Bestandteil der Infektabwehr. Neutrophile Granulozyten scheinen zudem zu einer Leberzellschädigung zu führen (HOLMAN, SABA, 1988; MALLICK et al., 1989) und somit ein wichtiger Bestandteil in der Ursache des Leberversagens in der Sepsis zu sein.

3.1.3.5 Pathogenese des Leberversagens

In der Sepsis gibt es eine frühe, extrahepatisch bedingte, und eine späte, intrahepatisch bedingte, Dysfunktion der Leber.

Die frühe hepatische Dysfunktion wird verursacht durch eine verminderte Durchblutung der Leber. Die Leber wird über zwei Gefäßsysteme, die Arteria hepatica und Vena portae, versorgt. Ein Grund, durch welchen der hepatische Blutfluss über die Portalvene in der Sepsis vermindert ist, ist die durch Endotoxin verursachte Vasokonstriktion im Splanchnikusgebiet (NAVARATNAM et al., 1990). Eine verminderte portaler Blutfluss führt normalerweise regulatorisch, z. B. beim hämorrhagischen Schock, zu einem erhöhten Blutfluss über die Arteria hepatica (LAUTT, MCQUAKER, 1989). Dieser Regulationsmechanismus ist in der Sepsis gestört, was zu einer verminderten Durchblutung (AYUSE et al., 1995) und damit zu hypoxischen Schädigung der Leber führt.

Die zweite, intrahepatische Dysfunktion wird verursacht durch einen Überlauf an bakteriellen Mediatoren, Endotoxin und Zytokinen. Es kommt zur lokalen Schädigung von Hepatozyten und Endothelzellen mit anschließender Einwanderung neutrophiler Granulozyten und Bildung zentroazinärer Nekrosen (ISKANDER et al., 2013). Infolge der Leberzell- und Endothelzellschädigung kommt es wie bereits oben erwähnt zur Cholestase und verminderter Entgiftungsleistung.

Es gibt Untersuchungen, die bereits in der hyperdynamen Phase der Sepsis bei Hyperperfusion der Leber eine Leberfunktionsstörung nachweisen konnten. Ursächlich für diese Leberfunktionsstörung scheinen in der frühen Sepsis nicht Mikrozirkulationsstörungen, sondern vielmehr zirkulierende Zytokine, wie das TNF- α , zu sein (WANG, CHAUDRY, 1996). So konnte durch Wang et al. in der Frühphase der Sepsis bei Ratten, 2 bis 10 h nach Zökum Ligatur und Punktion (CLP), eine Hyperperfusion der Leber bei gleichzeitiger Leberfunktionsstörung beobachtet werden (WANG et al., 1991; WANG et al., 1992).

3.1.4 Therapie der Sepsis

Die Therapie der Sepsis setzt sich zusammen aus (a.) einer kausalen, (b.) einer supportiven, und (c.) einer adjunktiven Therapie, sowie (d.) weiterer supportiver Maßnahmen und (e.) der Rehabilitation und Nachsorge (REINHART et al., 2010).

(a.) Kausale Therapie

Zu der kausalen Therapie gehören die Fokussanierung und die antimikrobielle Therapie.

Die operative Fokussanierung als Voraussetzung einer erfolgreichen Sepsistherapie kann die Entfernung von Implantaten, die Inzision und Drainage von Abszessen, die Wunderöffnung, eine Nekrektomie, Amputation und Fasziotomie, sowie die Behandlung einer Peritonitis, Anastomoseninsuffizienz und eines Ileus beinhalten (REINHART et al., 2010).

Die Revision der Leitlinien von 2012 beinhaltet eine Änderung bezüglich der antibiotischen Therapie. So ist der Grundsatz nicht mehr „hit hard and early“, sondern „hit smart and clever“. Das bedeutet, dass von Anfang an eine empirische kalkulierte Monotherapie, welche die zu erwartenden Erreger abdeckt, meist ausreichend ist (KOCHANNEK et al., 2012). Zuvor war eine breite Kombinationstherapie mit erneuter Evaluierung und Deeskalation nach Empfindlichkeit nach 48 bis 72 h empfohlen. Die initiale antibiotische Therapie sollte nach Abnahme von Blutkulturen frühzeitig (innerhalb einer Stunde) begonnen werden. Insgesamt sollte die antibiotische Therapie dabei einen Zeitraum von 7 bis 10 Tagen nicht überschreiten (REINHART et al., 2010).

(b.) Supportive Therapie

Die supportive Therapie beinhaltet die Stabilisierung der Hämodynamik, um die Sauerstoffversorgung der Organe zu gewährleisten. Dafür werden bei Hypotension neben Volumen- und Flüssigkeitsgabe bei insuffizienter Kreislaufstabilisierung Vasopressoren, vorzugsweise Noradrenalin, eingesetzt. Bei eingeschränktem Herzzeitvolumen kommt das Katecholamin Dobutamin zum Einsatz. Zu erwägende Substanzen bei weiterhin bestehender linksventrikulärer Pumpfunktionsstörung sind Adrenalin, Phosphodiesterasehemmer oder Levosimendan. Bei der Volumentherapie kommen kristalloide Infusionslösungen als erste Wahl zum Einsatz. Hierbei wird der Einsatz von balancierter isotonischer Vollelektrolytlösung empfohlen. Isotone Kochsalzlösung soll gemäß der neuen S3-Leitlinie von 2014 zur Volumentherapie beim Erwachsenen nicht gegeben werden (MARX et al., 2014). Der Einsatz von Albumin kann in ausgewählten Fällen, wie der Leberinsuffizienz, indiziert sein. Eine Indikation für Hydroxyethylstärke-Lösung als initiale Volumentherapie besteht nicht (REINHART et al., 2010). Humanalbumin und Gelatine können zudem dann gegeben werden, wenn nach Einschätzung des Arztes eine Hypotonie allein durch Kristalloide Lösung nur unzureichend therapiert werden kann (MARX et al., 2014). Als Zielwerte der initialen Volumentherapie wurden bislang folgende Parameter angegeben:

- ZVD > 8 bzw. > 12 mmHg unter mechanischer Beatmung
- MAP > 65 mmHg
- Diurese > 0,5 ml/kg/h
- zentralvenöse Sauerstoffsättigung (ScvO₂) > 70 %
- Laktat < 1,5 mmol/l bzw. Abfall des Laktats

Aus der neuen S3-Leitlinie zur Volumentherapie bei Erwachsenen geht hervor, dass außerdem immer eine klinische Beurteilung in Zusammenschau mit den apparativen Untersuchungen zur Steuerung der Volumentherapie erfolgen muss. Bei den apparativen Überwachungsverfahren sind diejenigen vorzuziehen, die eine Einschätzung der Volumenreagibilität anhand flussbasierter (Schlagvolumen) und/oder dynamischer Vorlastparameter (Schlagvolumen-Varianz, Pulsdruck-Variation) ermöglichen, und nicht die statistischen Parameter, wie ZVD und Pulmonalarterieller Okklusionsdruck (MARX et al., 2014). Zudem wird bei Nierenversagen gegebenenfalls eine Nierenersatztherapie durchgeführt. Die frühzeitige Beatmung der Sepsispatienten ist ebenfalls ein wichtiger Bestandteil der supportiven Therapie. Hierbei sollte eine minimale oximetrisch gemessene Sauerstoffsättigung von 90 % angestrebt werden (REINHART et al., 2010).

(c.) Adjunktive Therapie

Als adjunktive Therapie kann in ausgewählten Fällen eine Therapie mit niedrigdosierten Glukokortikoiden, Insulin, Selen und IgM angereichertes IgG erwogen werden (REINHART et al., 2010).

(d.) Weitere supportive Maßnahmen

Als supportive Maßnahmen werden von der Deutschen Sepsisgesellschaft folgende Behandlungen empfohlen:

- Thromboseprophylaxe mit unfraktioniertem oder niedermolekularem Heparin
- eine enterale Ernährung wird der parenteralen Ernährung vorgezogen. Allerdings muss bei unzureichender Kalorienzufuhr eine parenterale Ernährung zusätzlich zur enteralen Ernährung durchgeführt werden
- eine Ulkusprophylaxe mit Protonenpumpeninhibitoren oder Histamin-2-Rezeptorblockern
- „Bei normalisierter Gewebepfusion und in Abwesenheit einer klinisch relevanten koronaren Herzerkrankung oder Blutung wird eine Behandlung mit Erythrozytenkonzentraten empfohlen, wenn der Hb unter 7,0 g/dl (4,4 mmol/l) fällt.

Der Hb sollte dann auf 7,0 bis 9,0 g/dl (4,4 bis 5,6 mmol/l) angehoben werden“ (REINHART et al., 2010)

- adäquate Analgesie und Sedierung nach Bedarf

3.2 Melatonin

3.2.1 Physiologie

3.2.1.1 Synthese, Sekretion und Katabolismus

Melatonin ist ein Hormon, das bei Säugetieren hauptsächlich in der Epiphyse (Zirbeldrüse, Glandula pinealis) gebildet wird. Chemisch handelt es sich bei Melatonin um 5-Methoxy-N-acetyltryptamin. Melatonin wird über mehrere Syntheseschritte aus der Aminosäure L-Tryptophan gebildet, die über das Blut in die Pinealozyten der Zirbeldrüse aufgenommen wird (BOUTIN et al., 2005). Zunächst wird Tryptophan zu 5-Hydroxytryptophan hydroxyliert und zu 5-Hydroxytryptamin (5-HT, Serotonin) decarboxyliert. Anschließend erfolgt eine Acetylierung am freien Amin durch das Enzym Serotonin-N-Acetyltransferase (AANAT), was den limitierenden Schritt der Synthese darstellt. Das so entstandene N-Acetylserotonin wird nun durch das Enzym Hydroxyindol-O-methyltransferase zu Melatonin O-methyliert.

Melatonin ist ein stark lipophiles Hormon und wird per Diffusion in die Blutbahn abgegeben. Nach seiner Synthese in der Epiphyse kann es nicht gespeichert werden und wird direkt ausgeschüttet. Somit spiegelt die Melatonin-Plasmakonzentration die Aktivität der Epiphyse wieder. Melatonin ist im Blut zu 70 % an Albumin und zu einem geringeren Teil an das Akute-Phase-Protein Orosomukoid (alpha-1-acid glycoprotein) gebunden (CLAUSTRAT et al., 2005).

Melatonin wird zu 6-Hydroxymelatonin und N-acetyl-5-hydroxytryptamin (N-Acetylserotonin) umgewandelt und nachfolgend durch Konjugation mit Sulfat oder Glucuronsäure weiter metabolisiert und im Urin ausgeschieden (YOUNG et al., 1985). Zudem wird Melatonin enzymatisch über die Bildung von N¹-Acetyl-N²-formyl-5-methoxykynuramin (AFMK), welches durch Deformylierung in die stabilere Form N¹-Acetyl-5-methoxykynuramin (AMK) übergeführt wird, abgebaut (siehe Abschnitt 3.2.4.1 Antioxidative Wirkung). Zu ca. 15 % wird Melatonin unverändert über den Urin und die Leber ausgeschieden.

Die Epiphyse stellt nicht den einzigen Produktionsort für Melatonin dar. Auch in Geweben, wie der Retina von Ratten und Mäusen (CARDINALI, ROSNER, 1971; TOSINI,

MENAKER, 1998), dem Knochenmark von Mäusen und Menschen (CONTI et al., 2000), der menschlichen Haut (SLOMINSKI et al., 2002), den menschlichen Thrombozyten (CHAMPIER et al., 1997), den menschlichen Lymphozyten (CARRILLO-VICO et al., 2004), dem Ovar (ITOH et al., 1997), den Hoden von Ratten (TIJMES et al., 1996), der Harderschen Drüse von Hamstern (MENENDEZ-PELAEZ et al., 1987) und dem Gastrointestinaltrakt von Ratten (BUBENIK et al., 1977) konnte eine Melatoninbildung bzw. die Enzyme der Melatoninsynthese nachgewiesen werden.

3.2.1.2 Melatonin als Zeitgeber

Melatonin wird von der Epiphyse bei Nacht ausgeschüttet. Gesteuert wird diese Ausschüttung durch den Nucleus suprachiasmaticus (SCN), dem Oszillator, der durch den Tractus retinohypothalamicus Lichtinformation erhält. Es ist anzunehmen, dass spezielle Ganglienzellen der Retina an dieser Informationsübertragung beteiligt sind. Diese Ganglienzellen reagieren direkt auf Lichteinfall und projizieren direkt in den SCN (REPPERT, WEAVER, 2002). Stäbchen und Zapfen sind ebenfalls an der Informationsübertragung beteiligt. Durch diese exogenen Einflüsse ist der SCN auf einen 24 h-Rhythmus synchronisiert. Der SCN projiziert über den Nucleus paraventricularis, die intermediolateralen Hörner des zervikalen Rückenmarks und dem sympathischen Ganglion cervicale superius (SCG) auf die Epiphyse. Bei Stimulation durch den SCN kommt es zu einer Aktivierung des Enzyms AANAT und somit zur Aktivierung der Melatoninsynthese (SCHOMERUS, KORF, 2005). Nächtlicher Lichteinfall führt zu einer schnellen Verminderung der Melatoninsynthese durch proteolytische Spaltung der AANAT (GASTEL et al., 1998).

Durch diese Regulation der Melatoninsynthese leitet Melatonin die Information über den photoperiodischen 24 h-Rhythmus des SCN an den Organismus weiter. Es fungiert somit als Mediator des zirkadianen Rhythmus.

Melatonin wird wie oben erwähnt nachts ausgeschüttet mit einer maximalen Plasmakonzentration zwischen 2 und 4 Uhr. Diese Melatoninausschüttung ist direkt proportional zur Nachtlänge (CARDINALI, PEVET, 1998). Somit kodiert Melatonin nicht nur einen Tag/Nacht-Rhythmus sondern spiegelt auch saisonale Änderungen in der Photoperiodik wieder (GOLDMAN, 2001).

3.2.2 Melatoninrezeptoren

(a.) Die MT-1/-2-Rezeptoren

1994 konnten Reppert et al. das erste Mal den Melatoninrezeptor MT-1 (Mel_{1A}) und 1995 den Melatoninrezeptor MT-2 (Mel_{1B}) im Menschen nachweisen (REPPERT et al., 1994; REPPERT et al., 1995). Dabei handelt es sich um membranständige heptahelikale Rezeptoren, welche an unterschiedliche G-Proteine gekoppelt sind. Über diese G-Proteine regulieren sie eine Vielzahl an intrazellulären Signalkaskaden, zu denen die Adenylatzyklase (AC), die Phospholipase C (PLC), die Phospholipase A₂ (PLA₂), Kalium-Kanäle (K⁺-Kanäle), Kalzium-Kanäle, Guanylatzyklase und cGMP-Phosphodiesterase gehören (NEW et al., 2003).

Es gibt Anhaltspunkte dafür, dass die MT-1/-2-Rezeptoren nicht nur als Monomere, sondern auch als Homodimere oder Heterodimere vorliegen könnten (AYOUB et al., 2002; PRADA et al., 2005). Wobei die Bildung von MT-1-Homodimeren und MT-1/-2-Heterodimeren häufiger vorkommt als die Bildung von MT-2-Homodimeren (AYOUB et al., 2004). Eine Heterodimerisierung könnte in Zellen vorkommen, in denen sowohl MT-1- als auch MT-2-Rezeptoren exprimiert werden, zu denen unter anderem diejenigen der Retina, der Arterien und des Fettgewebes gehören.

(b.) Der MT-3-Rezeptor

1988 wurde erstmalig von Duncan et al. der niedrigaffine MT-3-Rezeptor beschrieben (DUNCAN et al., 1988). Spätere Studien zeigten, dass der MT-3-Rezeptor von Hamstern eine 95 %ige Homologie mit der menschlichen Quinonreduktase-2 (QR2) aufweist und es wurde postuliert, dass es sich um dasselbe Protein handelt (NOSJEAN et al., 2000). Bekräftigt wurde diese Annahme dadurch, dass es eine Korrelation zwischen der MT-3-Bindung und QR2-Aktivität zu geben scheint, die allerdings arten- und gewebsspezifisch ist (NOSJEAN et al., 2001). Zudem konnte Mailliet et al. zeigen, dass QR2^{-/-}-Mäuse keine MT-3-Bindungsstelle aufweisen (MAILLIET et al., 2004).

Nicht ganz in Einklang mit dieser Annahme scheint die Erkenntnis zu sein, dass der MT-3-Rezeptor als membrangebunden beschrieben wurde (DUNCAN et al., 1988), wohingegen die QR2 ein zytosolisches Enzym darstellt. Zudem konnten hochaffine MT-3-Liganden nachgewiesen werden, ohne Nachweis eines entsprechendem Einflusses auf die katalytische Aktivität der QR2 (MAILLIET et al., 2005).

Für diese Beobachtungen gibt es mehrere Erklärungsansätze. Zum einen, dass eventuell ein QR2-Monomer ohne katalytische Aktivität membrangebunden vorliegt (die QR2 liegt

normalerweise als Homodimer vor), zum anderen, dass ein Teil der QR2-Homodimere mit der Plasmamembran assoziiert vorliegen könnten (JOCKERS et al., 2008).

(c.) Nukleäre Rezeptoren

Melatonin kann seine Wirkung auch über die nukleären Rezeptoren ROR (receptor tyrosine kinase-like orphan receptor) und RZR (retinoid Z receptor) vermitteln, zu denen z. B. der ROR α 1 und der RZR α gehören (WIESENBERG et al., 1995). Beispiele für eine solch vermittelte Wirkung könnten die chronobiologische Aktivität und die Regulierung von Leukozyten sein (POZO et al., 2004; AGEZ et al., 2007; LARDONE et al., 2009). Kontrovers diskutiert wird die Frage, inwiefern Melatonin über eine direkte Interaktion mit den nukleären Rezeptoren seine Wirkung ausübt. So gibt es einige Autoren, die postulieren, dass Melatonin einen direkten Liganden der nukleären Rezeptoren darstellt (ACUNA-CASTROVIEJO et al., 1994; RAFII-EL-IDRISSI et al., 1998). Wobei Becker-Andre et al. ihre Behauptung, Melatonin würde ein direkter Ligand des RZR β sein, drei Jahre später revidiert haben (BECKER-ANDRE et al., 1994). Andererseits gibt es Hinweise darauf, dass der Einfluss des Pinealhormons auf die nukleären Faktoren über den MT-1-Rezeptor läuft (LARDONE et al., 2009).

3.2.2.1 Signaltransduktion der MT-1/-2-Rezeptoren

Die MT-1/-2-Rezeptoren vermitteln ihre Wirkung über unterschiedliche Signaltransduktionswege.

Dazu gehören unter anderem:

- die Inhibierung der AC über ein Pertussistoxin-sensitives G_i-Protein, welches an MT-1 und MT-2 gekoppelt ist (REPPERT et al., 1994; REPPERT et al., 1995) und darüber zu einer Hemmung der Proteinkinase A (HAZLERIGG et al., 1991) und zu einer verminderten Phosphorylierung und Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB (cyclic AMP-responsive element-binding protein) (MCNULTY et al., 1994) führt
- die Stimulierung der PLC-abhängigen Signaltransduktion (MACKENZIE et al., 2002): Nach Bindung von Melatonin an ein MT-2-gekoppeltes Pertussistoxin-sensitives G_{i/0}-Protein kommt es über die Aktivierung der PLC zu einer Stimulierung der Proteinkinase C (MCARTHUR et al., 1997; ZHAO et al., 2010)
- die Modulierung der PLA₂: Die PLA₂ scheint in ihrer Expression durch Melatonin über einen melatoninrezeptorabhängigen Mechanismus herunterreguliert zu werden (LI et al., 2000). Allerdings wurde auch eine Potenzierung der Wirkung der PLA₂ über

einen Proteinkinase C-abhängigen Weg durch Melatonin beschrieben (GODSON, REPERT, 1997)

- eine über den MT-2-Rezeptor vermittelte verminderte Stimulierung der Bildung des second messengers cGMP, welche durch die Guanylatcyclase katalysiert wird (PETIT et al., 1999)
- Regulierung unterschiedlicher K^+ -Kanäle, wie beispielsweise Kir- K^+ -Kanäle (NELSON et al., 2001) und Kalziumabhängiger K^+ -Kanäle (BKca) (GEARY et al., 1998; REGRIGNY et al., 1999)
- Öffnen spannungsabhängiger Kalziumkanäle über einen G-Proteingekoppelten Mechanismus nach Aktivierung von MT-1/ -2-Rezeptoren (LEW, FLANDERS, 1999)

3.2.2.2 Lokalisation der Rezeptoren

Melatoninrezeptoren konnten bereits in vielen verschiedenen Geweben nachgewiesen werden. Ein Beleg für das Vorliegen von mRNA des MT-1-Rezeptors sowie des MT-2-Rezeptors konnten durch mehrere Arbeitsgruppen für die Zellen der in Tabelle 3 aufgeführten Organe nachgewiesen werden. Für das Vorhandensein eines MT-3-Rezeptors gibt es Hinweise für die in Tabelle 3 aufgeführten Organe.

Tabelle 3: Lokalisation der MT-1-, MT-2- und MT-3-Rezeptoren

Rezeptor	Lokalisation
MT-1	<ul style="list-style-type: none"> • Großhirnrinde (Mensch) (MAZZUCHELLI et al., 1996) • Kleinhirn (Mensch) (AL-GHOUL et al., 1998) • Hippocampus (Ratte) (MUSSHOF et al., 2002), • Dopaminerges Transmittersystem mit Substantia nigra, ventralem Tegmentum, Nucleus caudatus, Putamen, Nucleus accumbens, Amygdala, Präfrontalem Cortex (Maus und Mensch) (UZ et al., 2005). • Nucleus suprachiasmaticus (Mensch) (WEAVER, REPERT, 1996), • Hypothalamus (Ratte) (SALLINEN et al., 2005), • Retina (Ratte) (FUJIEDA et al., 1999), • Leber (Maus) (NAJI et al., 2004), • Gallenblase (Mensch) (AUST et al., 2004), • Niere (Maus) (NAJI et al., 2004), • Nebenniere (Kapuzineraffe) (TORRES-FARFAN et al., 2003), • Koronararterien (Mensch) (EKMEKCIOGLU et al., 2001a; EKMEKCIOGLU et al., 2001b), • Kaudalarterie (Ratte) (MASANA et al., 2002), • Immunzellen (Mensch) (POZO et al., 2004), • Testes (Hamster) (FRUNGIERI et al., 2005), • Haut (Mensch) (SLOMINSKI et al., 2003), • Pankreas (Ratte) (MUHLBAUER, PESCHKE, 2007), • Dünndarm (Ratte) (SALLINEN et al., 2005), • Myometrium (Mensch) (SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH et al., 2003), • Plazenta (Mensch) (LANOIX et al., 2006) • Fettgewebe (Mensch) (BRYDON et al., 2001)
MT-2	<ul style="list-style-type: none"> • Gehirn (Maus) (NAJI et al., 2004), • Kleinhirn (Mensch) (AL-GHOUL et al., 1998), • Hippocampus (Ratte) (MUSSHOF et al., 2002), • Hypothalamus (Ratte) (SALLINEN et al., 2005), • Retina (Mensch) (REPERT et al., 1995), • Leber (Ratte) (SALLINEN et al., 2005), • Herz (Mensch) (EKMEKCIOGLU et al., 2003), • Aorta (Mensch) (EKMEKCIOGLU et al., 2003), • Koronararterien (Mensch) (EKMEKCIOGLU et al., 2003), • Kaudalarterie (Ratte) (MASANA et al., 2002), • endokriner Pankreas (Ratte) (MUHLBAUER, PESCHKE, 2007), • Dünndarm (Ratte) (SALLINEN et al., 2005), • Myometrium (Mensch) (SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH et al., 2003), • Plazenta (Mensch) (LANOIX et al., 2006) • Fettgewebe (Mensch) (BRYDON et al., 2001)
MT-3	<ul style="list-style-type: none"> • Leber, Niere, Gehirn, Herz, Fettgewebe, Muskel, Lunge (Hamster) (NOSJEAN et al., 2001). • Wahrscheinlich Vorhanden im Auge (Kaninchen) (PINTOR et al., 2001)

3.2.2.3 Regulation der Melatoninrezeptorexpression

Die Regulierung der Melatoninrezeptoren unterliegt einem circadianen Rhythmus. Bereits 1979 konnten Vacas und Cardinali. eine tageszeitliche Schwankung von Melatoninbindungsstellen im Gehirn von Hamstern und Ratten mit einer höheren Dichte tagsüber im Vergleich zur Nacht nachweisen (VACAS, CARDINALI, 1979). Eine direkte Wirkung auf die Rezeptordichte im Sinne einer Suppression durch Melatonin konnte durch Gauer et al. gezeigt werden (GAUER et al., 1992, 1993). Eine dreitägige Lichtexposition oder Pinealektomie erhöhte die Rezeptordichte signifikant in der Pars tuberalis und dem SCN von Nagetieren. Dies war durch einmalige Melatonininjektion reversibel. Melatonin hat dagegen keinen direkten Einfluss auf die Expression der MT-1-mRNA. So führt eine einmalige Melatonininjektion nicht zu einer Veränderung der täglichen Schwankungen der MT-1-mRNA-Expression in der Pars tuberalis von Hamstern. Die circadiane Rhythmik der Expression von MT-1-mRNA scheint durch eine direkte photoperiodische Regulation vermittelt zu sein (SCHUSTER et al., 2001).

Es scheint noch weitere Einflussfaktoren auf die Melatoninrezeptordichte zu geben. Zu diesen Faktoren gehört Estradiol als positiver Regulator (ZISAPEL et al., 1987). Das Alter sowie der Morbus Alzheimer sind negative Regulatoren der Melatoninrezeptordichte (LAUDON et al., 1988; BRUNNER et al., 2006).

3.2.2.4 Melatoninrezeptoragonist Ramelteon

Ramelteon, (S)-N-[2-(1,6,7,8-tetrahydro-2H-indeno[5,4-b]furan-8-yl)ethyl]propionamide (TAK-375), ist ein selektiver und potenter MT-1-/MT-2-Rezeptoragonist. Es hat eine höhere Affinität zu dem MT-1-Rezeptor als Melatonin, zeigt aber nur eine sehr gering ausgeprägte Affinität zum MT-3-Rezeptor. Zudem ist keine messbare Affinität zum Opiat-, Dopamin-, Benzodiazepin- und Serotoninrezeptor detektierbar (KATO et al., 2005). Im Gegensatz zu Melatonin besitzt Ramelteon kein antioxidatives Potential (MATHES et al., 2008b).

Nach oraler Gabe hat Ramelteon aufgrund eines großen hepatischen first-past effects nur eine Bioverfügbarkeit von 1,8 % nach einer Absorption von 84 %. Die Halbwertszeit ist mit 1,2 h kurz, aber länger als die von Melatonin, die bei weniger als 30 min liegt (PANDI-PERUMAL et al., 2009). Ramelteon wird in der Leber über das Cytochrom P450-System abgebaut. Zu den Metaboliten zählen M-I, M-II, M-III und M-IV, von diesen stellt M-II den Hauptmetaboliten mit der höchsten Blutkonzentration dar. Aufgrund dieser hohen Konzentration und der, wenn auch im Vergleich zu Ramelteon niedrigen, Affinität zum

MT-1/-2-Rezeptor, wird postuliert, dass M-II zur Wirkung Ramelteons beitragen könnte (PANDI-PERUMAL et al., 2009).

Nachdem Ramelteon in der Leber oxidiert wird, wodurch Carbonyl- und Hydroxylgruppen entstehen, erfolgt die Konjugation an Glucuronsäure. Die Ausscheidung erfolgt zu etwa 84 % über die Niere und zu einem sehr geringen Anteil über den Stuhl (MCGECHAN, WELLINGTON, 2005).

3.2.2.5 Melatoninrezeptorantagonist Luzindole

Luzindole (N-Acetyl-2-benzyltryptamin) ist ein Melatoninrezeptorantagonist der MT-1/-2-Rezeptoren ohne Affinität zum intrazellulären MT-3-Rezeptor. (NOSJEAN et al., 2001). Die Affinität zum MT-2-Rezeptor ist 25-mal höher als zum MT-1-Rezeptor (DUBOCOVICH et al., 1998). Ayoub et al. konnten nachweisen, dass Luzindole eine höhere Affinität zum MT-1/-2-Heterodimer als zum MT-2-Homodimer besitzt (AYOUB et al., 2004). Luzindole besitzt außerdem eine starke direkt antioxidative Wirkung und hemmt die Lipidperoxidation in vitro (REQUINTINA, OXENKRUG, 2007; MATHES et al., 2008d).

3.2.3 Protektive Eigenschaften von Melatonin

Für Melatonin konnte bereits in vielen Studien gezeigt werden, dass es in einer Vielzahl von Stressmodellen, unter anderem der Sepsis, einen protektiven Effekt aufweist. Dies konnte sowohl für die Verbesserung der Mortalitätsrate als auch im Bereich der Organprotektion gezeigt werden.

3.2.3.1 Positiver Einfluss auf die Letalität

Die prognostisch günstigen Effekte von Melatonin konnten sowohl in Studien mit Lipopolysaccharid- (LPS) (MAESTRONI, 1996; WU et al., 2001; CARRILLO-VICO et al., 2005b), CLP- (WICHMANN et al., 1996; WU et al., 2008) als auch CLI-induzierter (FINK et al., 2013a) Sepsis nachgewiesen werden. Auch bei viralen Infektionen, wie beispielsweise der viralen Encephalitis bei Mäusen, führt Melatonin zu einer verminderten Letalität (BEN-NATHAN et al., 1995).

In einer Studie von Wichmann et al. konnte gezeigt werden, dass eine kurzzeitige Melatoningabe bei Mäusen nach hämorrhagischem Schock und darauffolgender Sepsis mittels CLP eine signifikante Verbesserung der Überlebensrate zur Folge hatte (WICHMANN et al., 1996).

Bezüglich des Mechanismus, durch welchen Melatonin zu einer Überlebenszeitverlängerung führt, gibt es kontroverse Ansichten.

Die antioxidativen Eigenschaften von Melatonin, welche nachfolgend noch etwas genauer beschrieben werden, werden häufig als Erklärung für die Protektion angesehen. Einige Forschergruppen postulieren, dass eine Veränderung der Zytokinausschüttung und somit die Modulation der inflammatorischen Reaktion eine wichtige Rolle spielt. Diese Beobachtungen konnten in anderen Studien nicht nachgewiesen werden. Wu et al. konnten neben einer Überlebenszeitverlängerung bei Ratten nach LPS-Gabe eine verminderte TNF- α -Produktion, NO-Synthase-II Expression in der Leber und O₂•⁻-Formation in der Aorta beobachten. Sie postulieren daher einen Zusammenhang zwischen diesen Beobachtungen und der positiven Wirkung auf die Letalität (WU et al., 2001). Von Carrillo-Vico et al. konnte gezeigt werden, dass bei Mäusen mit durch LPS-induzierter Inflammation intraperitoneal verabreichtes Melatonin die Überlebenszeit signifikant verbessert. Sie führten diese positiven Effekte auf die Letalität auf die immunmodulatorischen, antioxidativen und antiapoptotischen Eigenschaften von Melatonin zurück, da Melatonin zu einer verminderten lokalen Konzentration proinflammatorischer Zytokine sowie zu einer erhöhten systemischen Konzentration des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 führte und einen Einfluss auf die Lipidperoxidation und Apoptose hatte (CARRILLO-VICO et al., 2005b).

Maestroni et al. konnten keine Veränderung der Zytokinausschüttung bei Mäusen mit LPS-induziertem Endotoxinschock beobachten (MAESTRONI, 1996).

Neben den Erklärungsansätzen für die Letalitätsverminderung aufgrund der antioxidativen und immunmodulatorischen Eigenschaften von Melatonin ist eine weitere wichtige Beobachtung, dass diese bei der Sepsis durch Melatonin rezeptorabhängig vermittelt wird (FINK et al., 2013a). Eine aktuelle Studie von Fink et al. zeigt, dass Melatonin rezeptorabhängig das Überleben von Ratten nach Sepsisinduktion mittels CLI signifikant verlängert (FINK et al., 2013a). Diese durch Melatonin und Ramelteon ausgelöste Überlebenszeitverbesserung war durch zusätzliche Gabe von Luzindole komplett antagonisierbar. Bei Melatoninrezeptor-knock-out-Mäusen hatten Melatonin, Ramelteon und Luzindole keinen Einfluss auf das Überleben der Tiere, was die rezeptorabhängige Wirkung von Melatonin weiter bekräftigt. Interessanterweise waren keine signifikanten Unterschiede in der Plasmakonzentration der Zytokine TNF- α , IL-6 und IL-10 nachweisbar, sodass die rezeptorabhängigen positiven Eigenschaften von Melatonin unabhängig von der Immunantwort zu sein scheinen.

3.2.3.2 Organprotektion

Im Bereich der Organprotektion konnte bereits von einigen Forschungsgruppen ein protektiver Effekt von Melatonin bei der Sepsis nachgewiesen werden. Die Erklärungsansätze sind auch hier nicht einheitlich.

Sener et al. konnten die organprotektiven Effekte von Melatonin bei Ratten bei einer CLP-induzierten Sepsis für die Organe Leber, Niere, Herz, Lunge, Zwerchfell und Gehirn nachweisen, indem sie die histologische Struktur der Organe, die Malondialdehyd- und Glutathionkonzentrationen, sowie die Myeloperoxidaseaktivität in den unterschiedlichen Versuchsgruppen untersuchten und verglichen. Eine Erhöhung der Transaminasen (Glutamat-Oxalazetat-Transaminase, Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT)) sowie des Kreatinins, als Zeichen für Leber und Nierenschädigung, waren durch Gabe von Melatonin vermindert. Die organprotektiven Eigenschaften von Melatonin führten sie auf die antioxidativen Eigenschaften von Melatonin zurück (SENER et al., 2005).

Neben einer verbesserten Überlebensrate bei der Sepsis durch Melatonin konnten Wu et al. nachweisen, dass Melatonin die Hyporeaktivität auf Noradrenalin und späte Hypotension, den Plasmaindex von hepatischer und renaler Dysfunktion, die Plasma-NO- und IL- β -Konzentration sowie aortale $O_2\bullet^-$ -Levels und die Infiltration von polymorphkernigen Neutrophilen in Lunge und Lebergewebe von Ratten verminderte. Somit zeigten sich auch hier organprotektive Eigenschaften von Melatonin (WU et al., 2008).

In einer Studie von Shang et al. konnte bei Ratten gezeigt werden, dass Melatonin das akute progressive Lungenversagen, ausgelöst durch intravenös gegebenes LPS, vermindert. Es zeigte sich eine Veränderung in der Zytokinausschüttung, sodass Shang et al. von einer Organprotektion durch Einfluss auf die inflammatorische Reaktion ausgehen (SHANG et al., 2009).

Sewerynek et al. konnten bei Ratten nach LPS-Injektion einen protektiven Effekt durch Melatonin ermitteln. Diesen zeigten sie anhand morphologischer Kriterien in der Leber, der Lipidperoxidation und der Konzentration von Glutathion und reduziertem Glutathion. Sie deuteten den protektiven Effekt bedingt durch die antioxidative Wirkung von Melatonin (SEWERYNEK et al., 1995b).

In Zusammenschau der bisher durchgeführten Studien zeigt sich deutlich, dass Melatonin einen vielversprechenden Ansatz in der Therapie der Sepsis bietet. Bezüglich der

Mechanismen, durch welche dieser zustande kommt, gibt es unterschiedliche Erklärungsansätze.

Im Folgenden werden die unterschiedlichen Mechanismen kurz vorgestellt.

3.2.4 Protektive Mechanismen von Melatonin

3.2.4.1 Antioxidative Wirkung

Der positive Einfluss von Melatonin auf eine Vielzahl von Schockformen wurde zunächst auf dessen antioxidative Wirkung zurückgeführt. Diese setzt sich zusammen aus der direkten antioxidativen Wirkung als Radikalfänger und aus der indirekt antioxidativen Wirkung durch Induktion antioxidativ wirkender Enzyme und Verhinderung der Entstehung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies.

(a.) Direkt antioxidative Wirkung

Die direkt antioxidative Wirkung von Melatonin beruht zum einen auf der Wirkung als Radikalfänger und zum anderen auf der Bildung protektiver Metabolite. (HARDELAND, 2005).

Durch Interaktion mit ROS oder reaktiver Stickstoffspezies (RNS) kommt es zur Bildung unterschiedlicher Metabolite. Dazu gehören AFMK, 6-Hydroxymelatonin (ZHANG et al., 1999b; HORSTMAN et al., 2002), 4-Hydroxymelatonin (HORSTMAN et al., 2002), 1-Nitrosomelatonin (nur *in vitro*-Nachweise: (BLANCHARD et al., 2000)) und Cyclic-3-hydroxymelatonin (PEYROT et al., 2003), welches durch Reaktion mit weiteren ROS zu AFMK weiter verstoffwechselt werden kann (TAN et al., 1998).

Das protektive AFMK kann enzymatisch (HIRATA et al., 1974; SILVA et al., 2000), pseudoenzymatisch (SEMAK et al., 2005), durch Interaktion von Melatonin mit ROS und RNS (HARDELAND et al., 1995; TAN et al., 2000; HARDELAND et al., 2003) oder durch photokatalytische Reaktion aus Melatonin entstehen (DE ALMEIDA et al., 2003; HARDELAND et al., 2009).

AFMK selber besitzt eine Funktion als Radikalfänger (BURKHARDT et al., 2001; HARDELAND, 2010) und kann zu AMK (HIRATA et al., 1974; SEEVER, HARDELAND, 2008) metabolisiert werden, ein protektiver Metabolit (RESSMEYER et al., 2003) mit antioxidativen Eigenschaften (RESSMEYER et al., 2003; HARDELAND et al., 2009; SCHAEFER, HARDELAND, 2009).

(b.) Indirekt antioxidative Wirkung

Indirekt antioxidative Wirkung durch Enzyminduktion

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass Melatonin in oxidativen Stressmodellen, eine Hochregulierung antioxidativ wirksamer Enzyme bewirkt. Dies konnte für die Enzyme Glutathionperoxidase (SEWERYNEK et al., 1995a; PABLOS et al., 1998; SHEN et al., 2002a; NAIDU et al., 2003; GOMEZ et al., 2005; PAN et al., 2006), Superoxiddismutase (ANTOLIN et al., 1996; SHEN et al., 2002a; NAIDU et al., 2003) und Katalase (DZIEGIEL et al., 2003; NAIDU et al., 2003; GOMEZ et al., 2005) nachgewiesen werden. Es gibt Hinweise darauf, dass es sich um eine rezeptorabhängige Regulierung handeln könnte (MAYO et al., 2002; REZZANI et al., 2006).

Melatonin besitzt außerdem die Eigenschaft, prooxidative Enzyme zu regulieren und somit der Entstehung reaktiver Sauerstoff- bzw. Stickstoffspezies entgegenzuwirken. Eine verminderte Aktivität bzw. Genexpression konnte für die Enzyme 12-Lipoxygenase (ZHANG et al., 1999a), 5-Lipoxygenase (STEINHILBER et al., 1995), der konstitutionellen NO-Synthase (POZO et al., 1994; BETTAHI et al., 1996) und der iNO-Synthase (GILAD et al., 1998; CRESPO et al., 1999) gezeigt werden. Es gibt Hinweise darauf, dass die Modulation der 12-Lipoxygenase rezeptorabhängig ist, da dies durch den Melatoninrezeptorantagonisten Luzindole antagonisierbar ist (ZHANG et al., 1999a).

3.2.4.2 Mitochondrien

Melatonin verringert die schädigende Wirkung des unter pathophysiologischen Bedingungen vermehrt gebildeten NO• (CASSINA, RADI, 1996; SZABO et al., 1996; TITHERADGE, 1999) und führt zu einer verminderten Bildung oxidativen Stresses, zur Protektion der Komplexe der Atmungskette, zur erhöhten Aktivität der Atmungskette und einer vermehrten ATP-Produktion (ESCAMES et al., 2007; TAPIAS et al., 2009). Melatonin reduziert die Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials in Astrozyten von Ratten und deren Apoptose, welche durch reaktive Spezies, wie z. B. dem Wasserstoffperoxid, induziert wird (JOU et al., 2004).

3.2.4.3 Immunmodulatorische Wirkung

Melatonin hat auch im Immunsystem einen regulierenden Einfluss. Dies lässt sich schon daraus vermuten, dass Melatonin in einigen Immunzellen, wie z. B. menschlichen Monozyten und Lymphozyten selbst gebildet wird (FINOCCHIARO, GLIKIN, 1998; CARRILLO-VICO et al., 2004). Außerdem sind in einigen Immunzellen, wie den menschlichen Monozyten

(BARJAVEL et al., 1998), T-Lymphozyten (KONAKCHIEVA et al., 1995) und Thrombozyten (VACAS et al., 1992), Melatoninrezeptoren nachweisbar (CARRILLO-VICO et al., 2003; POZO et al., 2004). Dies sind Hinweise auf eine intrakrine, autokrine und parakrine Funktion von Melatonin.

Die immunmodulatorische Wirkung von Melatonin ist äußerst komplex und abhängig vom Immunstatus. Es konnten sowohl proinflammatorische (CAROLEO et al., 1992; MORREY et al., 1994; CURRIER et al., 2000) als auch antiinflammatorische Effekte durch Melatonin nachgewiesen werden, wobei die proinflammatorischen Effekte vor allem bei Immunsuppression nachweisbar waren (CARRILLO-VICO et al., 2005a). Im Rahmen einer Inflammation ist die Wirkung Melatonins nicht einheitlich geklärt. Es zeigt sich eine Tendenz, dass es zu einer verminderten Ausschüttung proinflammatorischer (BAYKAL et al., 2000; WU et al., 2001) und einer vermehrten Ausschüttung antiinflammatorischer Zytokine kommt (CARRILLO-VICO et al., 2005b). Darüber hinaus wirkt Melatonin immunmodulatorisch über den Arachidonsäurestoffwechsel (STEINHILBER et al., 1995; LI et al., 2000).

3.2.4.4 Rezeptorabhängige organprotektive Wirkung

Die Wirkungen und die protektiven Eigenschaften von Melatonin in der Sepsis wurden, wie in den vorangehenden Abschnitten zu lesen, ausführlich untersucht. Es gibt jedoch wenige Daten zur rezeptorabhängigen Wirkung in der Sepsis. Die bereits erwähnte Studie von Fink et al. zeigt eine melatoninrezeptorabhängige Verringerung der Letalität von Ratten in der Sepsis, welche unabhängig von immunmodulatorischen Vorgängen zu sein scheint (FINK et al., 2013a).

Interessant bleibt die Frage, wodurch die rezeptorabhängigen positiven Eigenschaften von Melatonin vermittelt werden. Da ein prognostisch bedeutsamer Faktor in der Sepsis das Organversagen ist, liegt es nahe, die melatoninrezeptorabhängige organprotektive Wirkung näher zu beleuchten.

Bei einer Vielzahl von Krankheitsbildern, jedoch nicht bei der Sepsis, konnte diese nachgewiesen werden. Hierzu zählen die Studien von Rezzani et al. zur Cyclosporin-A-induzierten Kardiotoxizität bei Ratten (REZZANI et al., 2006), von Lochner et al. zu den Kurz- und Langzeiteffekten nach myokardialer Ischämie und Reperfusion bei Ratten (LOCHNER et al., 2006), von Husson et al. zur periventrikulären Leukomalazie bei Mäusen (HUSSON et al., 2002) und von Brzozowski et al. zur stressinduzierten Magenläsionen bei Ratten (BRZOZOWSKI et al., 2005). Allen gemeinsam ist, dass der

organprotektive Effekt durch den Melatoninrezeptorantagonisten Luzindole aufgehoben werden konnte.

Ein weiteres Organ, welches in Hinblick auf die rezeptorabhängige Protektion durch Melatonin untersucht wurde, ist die Leber. Im hämorrhagischen Schockmodell bei Ratten konnte ein protektiver Effekt durch Vorbehandlung mit Melatonin auf die Leberfunktion nachgewiesen werden. Diese Leberfunktionsverbesserung, gemessen an der Plasmaverschwinderate von Indozyaningrün, konnte durch den Melatoninrezeptorantagonisten Luzindole antagonisiert werden (MATHES et al., 2008a; MATHES et al., 2008c).

Ebenfalls ein Hinweis auf die rezeptorvermittelte Organprotektion von Melatonin ist, dass Ramelteon im hämorrhagischen Schockmodell die Leberfunktion und die hepatische Perfusion bei Ratten verbessert (MATHES et al., 2008b).

3.3 Ziel der Studie

Die Sepsis stellt mit einer 90-Tage-Sterblichkeit von bis zu 55 % eine Erkrankung dar, bei der die Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten notwendig und klinisch relevant ist. Ein wichtiger Bestandteil in der Pathogenese der Sepsis ist die Organschädigung durch eine Hypoxie, unter anderem bedingt durch Mikrozirkulationsstörungen. Diese Organschädigung hat als Organversagen, insbesondere bei der Leber, prognostische Bedeutung (siehe Abschnitt 3.1.3.4 Leber in der Sepsis) (KRAMER et al., 2007).

Der Wirkstoff Melatonin ist Gegenstand aktueller Forschung. Melatonin hat bereits in einer Vielzahl von vorausgegangenen Studien einen protektiven Effekt während einer Sepsis gezeigt. Der Wirkmechanismus, über den Melatonin protektiv wirkt, ist noch nicht ausreichend geklärt. Eine rezeptorabhängige Wirkung scheint dabei wahrscheinlich. Dies zeigen aktuelle Untersuchungen aus unserem eigenen Forschungslabor, in denen gezeigt wurde, dass Melatonin rezeptorabhängig das Überleben bei Ratten und Mäusen in der Sepsis verbessert (FINK et al., 2013a).

Auf Grundlage unserer bisherigen Forschungsergebnisse und der aufgeführten Literatur bezüglich Melatonin, Sepsis und der Leber, stellt sich die Frage nach der leberprotektiven Wirkung von Melatonin in der Sepsis. Die Studie, die dieser Doktorarbeit zugrunde liegt, wurde durchgeführt, um die Bedeutung der Melatoninrezeptoraktivierung für die hepatische Mikrozirkulation und den hepatischen Zellschaden nach polymikrobieller Sepsis in der Maus zu erforschen.

Im Einzelnen sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Führt Melatonin zu einer Verbesserung der Mikrozirkulation der Leber in der experimentell induzierten Sepsis, untersucht anhand des hepatischen Perfusionsindex und der Erythrozytengeschwindigkeit?
2. Ist eine putative Veränderung der hepatischen Mikrozirkulation durch eine rezeptorabhängige Wirkung von Melatonin bedingt?
3. Führt Melatonin zu einer Verbesserung des Zellschadens in der Leber bei Sepsis?
4. Wenn ja, ist dies durch eine rezeptorabhängige Wirkung von Melatonin bedingt?

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Material

4.1.1 Versuchstiere

Alle Versuche wurden nach Genehmigung durch die zuständige Landesbehörde (Landesamt für Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz, Abt. H, Lebensmittel und Veterinärwesen, Saarbrücken, Versuchsnummer 16/2007) und nach den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes im experimentellen Forschungslabor der Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie der Universitätsklinik des Saarlandes durchgeführt. Verwendet wurden männliche C3H/HeN-Mäuse (Gewicht im Mittel 20 ± 2 g) der Firma Charles River (Sulzfeld, Deutschland). Sie wurden bis zum Versuchsbeginn in der Versuchstierhaltung des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, Universitätsklinikum des Saarlandes gehalten. Dort herrschten klimatisierte Bedingungen (Lufttemperatur: 22 bis 24 °C, relative Luftfeuchte: ca. 60 %). Die Tiere hatten Zugang zu Labor-Standardfutter und Wasser. Um standardisierte Bedingungen für die Versuche zu schaffen, wurden die Tiere einem Tag-Nacht-Rhythmus ausgesetzt, wobei jeweils auf 12 h Lichtexposition 12 h Dunkelheit folgten. Die Versuche wurden zwischen den Zeitgeberzeiten 2 bis 4 h begonnen. Die Mäuse wurden 12 h vor Versuchsbeginn nüchtern gesetzt. Der Zugang zu Wasser wurde stets gewährleistet. Insgesamt wurden zunächst 60 Tiere eingeschlossen.

4.1.2 Medikamente und Chemikalien

Melatonin wurde von der Apotheke des Universitätsklinikums des Saarlandes (Homburg, Deutschland) bezogen. Ramelteon wurde von der Firma Takeda Pharmaceutical Company (Osaka, Japan) und Luzindole von der Firma Bachem (Bubendorf, Schweiz) verwendet. Diese Medikamente wurden mit 5 % Dimethylsulfoxid (DMSO) der Firma Sigma-Aldrich (München, Deutschland) zu einer Lösung verdünnt. Pentobarbital-Natrium (Narcorem) wurde von der Firma Merial (Halbergmoos) bezogen. Sterofundin und NaCl wurden von der Firma B Braun (Melsungen) verwendet. Alle anderen Chemikalien, welche im Abschnitt 4.2 erwähnt werden, wurden von der Firma Roth (Karlsruhe, Deutschland) und der Firma Sigma (München, Deutschland) hergestellt.

4.2 Methodik

4.2.1 CLI-Sepsismodell

Das von Scheiermann et al. beschriebene CLI-Sepsismodell (CLI = cecal ligation and incision) stellt ein Verfahren zur Induktion einer akuten fulminanten Sepsis bei Nagetieren dar (SCHEIERMANN et al., 2009). Durch Ligatur und Inzision des Zökums wird eine polymikrobielle Sepsis mit bakterieller Peritonitis, systemischer Inflammation und Organversagen hervorgerufen.

4.2.2 Narkose

Die Versuchsdurchführung erfolgte unter Allgemeinanästhesie. Vor Narkoseeinleitung wurden die Tiere gewogen (Präzisionswaage KERN 470-40 (Kern, Albstadt, Deutschland)). Anschließend wurde den Tieren gewichtsadaptiert 80 mg/kg Körpergewicht (KG) einer Pentobarbital-Natrium-Lösung in den linken unteren abdominellen Quadranten intraperitoneal injiziert. Die Narkosetiefe wurde mit Schmerzreizen und auditiven Reizen überprüft. Bei unzureichender Narkosetiefe wurde eine erneute Gabe von Pentobarbital-Natrium-Lösung in den rechten unteren Quadranten durchgeführt. Eine suffiziente Narkose wurde während des Ablaufs des Versuches durch eine bedarfsgerechte intravenös verabreichte Pentobarbital-Natrium-Lösung aufrechterhalten. Eine Spontanatmung blieb hierbei allzeit erhalten.

4.2.3 Chirurgisches Vorgehen

Die Mäuse wurden für die operativen Eingriffe zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur auf einer elektrischen Wärmeplatte in Rückenlage fixiert und die Körpertemperatur über eine rektale Sonde kontinuierlich gemessen.

Die Präparation begann mit einem Hautschnitt in der Medianlinie des Halses. Die Speicheldrüsen und die infrahyoidale Muskulatur wurden stumpf auseinanderpräpariert und zu beiden Seiten gelagert. Die somit freigelegte Trachea wurde durch stumpfe Präparation mit einer Pinzette vom umliegenden Bindegewebe gelöst. Es wurden 2 Fäden um die Trachea gelegt und vorgeknotet. Die Trachea wurde mit einer Pinzette mobilisiert und zwischen 2 Knorpelspangen eingeschnitten. Durch diesen Schnitt wurde eine Trachealkanüle (BD Venflon™ Pro Safety Sicherheitsvenenverweilkatheter, Größe 20G, Becton Dickinson Infusion Therapy AB, Helsingborg, Schweden) ca. 0,5 cm tief in die Trachea eingeführt und fixiert.

Zur kontinuierlichen Flüssigkeits- und Medikamentengabe wurde ein Zentraler Venenkatheter (ZVK) in die rechte Vena jugularis interna gelegt. Dieser Katheter bestand aus einem kleinlumigen Polyethylenschlauch (Smiths Medical ASD, Inc. Keene, NH, USA). Die rechte Vena jugularis wurde mit 2 Pinzetten stumpf frei präpariert, mobilisiert und nach kranial ligiert. Mit einer Gefäßpinzette wurde die Vena jugularis aufgespannt und mit einer Gefäßschere zu 1/3 des Gefäßdurchmessers inzidiert. Der mit Sterofundin vorgespülte Katheter wurde durch die Einschnittstelle eingeführt und ca. 1 cm in der Vena jugularis bis zur Vena cava superior vorgeschoben und fixiert. Die Spannung, die durch den kranialen Faden erzeugt wurde, wurde gelöst. Der kraniale Faden konnte dann ebenfalls genutzt werden, um den Katheter zu fixieren. Über einen Dreiwegehahn wurde der Venenkatheter an einen Perfusor *secura ft* (B Braun, Melsungen) angeschlossen, über dem im Laufe des Versuches kontinuierlich 0,1 ml/10 g/h Sterofundin appliziert wurden.

Die Anlage eines arteriellen Gefäßkatheters erfolgte in die linke Arteria carotis interna. Hierfür wurde ein Polyethylenschlauch (Smiths Medical ASD, Inc. Keene, NH, USA) verwendet. Die linke Arteria carotis interna wurde unter dem Mikroskop (Swift Instruments International S.A., Serie SM-80, Tokio, Japan) aus der Gefäß-Nerven-Scheide freipräpariert und mobilisiert, nach kranial ligiert und mit einer Gefäßklemme kaudal abgeklemmt. Zwischen Klemme und kranialer Ligatur wurde mithilfe einer Gefäßpinzette und mikrochirurgischen Gefäßschere die Arterie eröffnet, und der mit Sterofundin gespülte Katheter durch die Schnittstelle eingeführt und bis kurz vor die Klemme vorgeschoben. Nach Öffnen der Klemme wurde der Katheter ca. 1 cm vorgeschoben und mittels Ligaturen fixiert. Der arterielle Zugang diente der kontinuierlichen Messung des Blutdruckes und der Herzfrequenz zur Dokumentation über ein Monitorsystem (Monitor Modul 66S, Hewlett Packard Palo Alto, Calif).



Abbildung 1: Halssitus nach Einlage der Trachealkanüle und der Gefäßkatheter in die Vena jugularis interna (rechts) und die Arteria carotis interna (links)

Zur Sepsisinduktion wurde zunächst eine ca. 2 cm große mediane Laparotomie entlang der Linea alba durchgeführt. Das Zökum wurde vorsichtig aufgesucht und aus dem Abdomen mobilisiert und auf einer Komresse abgelegt. Anschließend wurden mit einem Polyesterfaden (Ethicon, Johnson and Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland) das Zökum und die versorgenden mesenterialen Blutgefäße proximal ligiert, ohne die Darmpassage dabei zu beeinträchtigen. Das Zökum wurde über die halbe Länge auf der antimesenterialen Seite inzidiert. Danach wurde das Zökum ins Abdomen zurückverlagert und die Bauchdecke durch Einzelknopfnähte mit einem 4-0 Polyesterfaden (Ethicon, Johnson and Johnson Medical GmbH, Norderstedt) verschlossen. Bei den Gruppen der scheinoperierten Tieren (Sham-Gruppen) (siehe nächster Abschnitt) wurde ebenfalls die beschriebene Laparotomie durchgeführt. Allerdings wurde das Zökum nach der Mobilisation ohne Ligatur und ohne Inzision in das Abdomen zurückverlagert.

4.2.4 Versuchstiergruppen

Direkt nach dem entsprechenden abdominalen Eingriff (Sepsisinduktion bzw. Scheinoperation) wurde den Tieren über den ZVK die Studienmedikation verabreicht.

Es wurden insgesamt 12 Gruppen gebildet, von denen 6 Gruppen aus scheinoperierten Tieren und 6 Gruppen aus Tieren mit Sepsis bestanden. In der Sham/Luzindole + Ramelteon-Gruppe wurde 1 Versuchstier aufgrund unvollständig erhobener Daten retrospektiv ausgeschlossen, sodass 59 Tiere in die statistische Auswertung mit eingingen. Sowohl bei den scheinoperierten als auch bei den Tieren mit Sepsis wurden folgende Medikamente verabreicht: Melatonin (1 mg/kg KG), Ramelteon (1 mg/kg KG), Luzindole (1 mg/kg KG), Melatonin plus Luzindole (jeweils 1 mg/kg KG) oder Ramelteon plus Luzindole (jeweils 1 mg/kg KG). Die Tiere der Vehikel-Gruppe bekamen ein entsprechendes Volumen (ca. 0,1 ml) einer 5 %igen DMSO-Lösung.

Tabelle 4: Übersicht Versuchsgruppen

Versuchsgruppe	Anzahl der Tiere
Sham/Vehikel	n = 5
Sham/Melatonin	n = 5
Sham/Ramelteon	n = 5
Sham/Luzindole	n = 5
Sham/Luzindole + Melatonin	n = 5
Sham/Luzindole + Ramelteon	n = 4
Sepsis/Vehikel	n = 5
Sepsis/Melatonin	n = 5
Sepsis/Ramelteon	n = 5
Sepsis/Luzindole	n = 5
Sepsis/Luzindole + Melatonin	n = 5
Sepsis/Luzindole + Ramelteon	n = 5
Gesamt	n = 59

4.2.5 Messung der Vitalparameter

Über einen Zeitraum von 5 h wurden die Tiere am Monitor überwacht. Der arterielle Druck und die Herzfrequenz wurden über den Karotiskatheter und die Temperatur über eine rektal eingeführte Temperatursonde kontinuierlich gemessen und dokumentiert.

4.2.6 Fluoreszenzmarkierung der Erythrozyten

Erythrozyten von C3H/HeN-Mäusen wurden wie zuvor bei Zimmerhackl et al. mit Rattenerthrozyten beschrieben, analog mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markiert (ZIMMERHACKL et al., 1983). Dazu wurde zunächst das mit einer heparinisierten Spritze aufgezugene Vollblut (ca. 1 ml) in einer Mikroliterzentrifuge (Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen) zentrifugiert. Die so gewonnenen ca. 0,6 ml Erythrozyten wurden 3-mal mit Alserver Puffer im Verhältnis 1:1 (Glucose-Citrat-Puffer, pH 6,2) gewaschen und danach bei 20 °C mit 3000 U/min für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dazwischen abgenommen und verworfen. Danach wurden die Erythrozyten mit Bicine Puffer im Verhältnis 1:1 (pH 8,3) gewaschen und bei 20 °C mit 3000 U/min für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Nun wurden die Erythrozyten zu einem Hämatokrit von 50 % mit Bicine Puffer verdünnt. Das so erhaltene Gemisch wurde zu FITC, welches in Dimethylformamid gelöst war, gegeben (4 mg FITC/1 ml Erythrozytengemisch. Das Erythrozyten-Puffergemisch wurde mit Alufolie eingewickelt und für 3 h im Wasserbad bei 25 °C und 60 Oszillationen pro min im Unitherm Hybridisierungswasserbad (UniEquip, Marinsried, Deutschland) inkubiert. Danach wurde das Gemisch erneut zentrifugiert, der Überstand abgenommen und verworfen. Die Zellen wurden mit Bicine Puffer (Verhältnis 1:1) gewaschen und zentrifugiert (20 °C, 3000 U/min, 3 min). Danach wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Die Erythrozyten wurden 4-mal mit NaCl 0,9 % (Verhältnis 1:1) gewaschen, zentrifugiert (20 °C, 3000 U/min, 3 min) und danach jeweils der Überstand abgenommen und verworfen. Die Erythrozyten wurden mit NaCl 0,9 % zu einem Hämatokrit von 50 % verdünnt. Danach wurden 0,14 ml Citrat-Phosphat-Dextrose-Puffer pro ml Erythrozyten-NaCl-Gemisch hinzugefügt. Die FITC-Erythrozyten wurden in Alufolie im Kühlschrank gelagert und innerhalb von 10 Tagen verwendet.

4.2.7 Intravitalmikroskopie

4.2.7.1 Chirurgische Vorbereitung und Lebermobilisation

Die Lebermobilisation wurde im Rotlicht durchgeführt um einen phototoxischen Schaden der Leber zu verhindern. Zur Lebermobilisation wurde zunächst ein medianer Hautschnitt unterhalb des Sternums durchgeführt. Das Fell wurde von der muskulären Bauchdecke

abpräpariert. Danach wurde ein 1 cm langer medianer Schnitt entlang der Linea alba auf Höhe des Processus xyphoideus durchgeführt und die epigastrischen Gefäße beidseits durch Umstechung ligiert. Auf der linken Seite wurde die Bauchdecke zwischen den beiden Ligaturen quer eingeschnitten und damit die Leber freigelegt. Das Ligamentum falciforme hepatis zwischen dem Zwerchfell und der Leber sowie das Ligamentum hepatogastricum zwischen Leber und Magen wurden mobilisiert und durchtrennt. Die Versuchstiere wurden auf einem Objektträger auf die linke Seite gelegt. Bei allen Tieren wurde der linke Leberlappen mobilisiert und ausgelagert um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Die Leber wurde über den Zeitraum der Lebermobilisation und der Intravitalmikroskopie repetitiv mit auf 37 °C erwärmter NaCl 0,9 % Lösung begossen um sowohl eine Austrocknung als auch eine Auskühlung zu vermeiden.

4.2.7.2 Durchführung

Mit dem Objektträger wurde die Maus auf das Zeiss AxioTech Fluoreszenz Mikroskop (AxioTech Vario 135, Carl Zeiss Inc., Jena) gelegt. Die Belichtung der Leber erfolgte mit einer 100 W Quecksilberlampe. Um die Mikrozirkulation der Leber zu beurteilen wurden Videosequenzen mit FITC-Erythrozyten aufgenommen. Dazu wurde den Mäusen zunächst 0,025 ml Natriumfluorescein (0,2 mg/ml) und dann 0,05 ml FITC-Erythrozyten injiziert. Die Belichtungszeit wurde auf 0,03/s gestellt. Die Aufnahmen wurden mit einem 40er Objektiv und einem Filterset mit einem 485-nm Anregungs- und einem 520-nm Emissionsfilter aufgenommen. Der Leberausschnitt wurde so gewählt, dass eine Zentralvene in einer Ecke des Bildes platziert war. Eine Videosequenz dauerte 10 s. Es wurden insgesamt 5 Aufnahmen mäanderförmig über die Leber verteilt durchgeführt. Die Auswertung der Videosequenzen erfolgte im off-line Modus wie unten beschrieben.

Um den hepatozellulären Schaden zu messen wurde den Tieren 0,01 ml Propidiumiodid (PI) (0,1 mg/ml) injiziert und nach 10 min Wartezeit die Bildsequenzen aufgenommen. Die Belichtungszeit wurde auf 0,06/s eingestellt, eine Aufnahme dauerten jeweils 10 Einzelbilder. Die Aufnahmen wurden mit einem Filterset von 485-nm Anregungs- und einem 520-nm Emissionsfilter durchgeführt. Zunächst erfolgte ein Übersichtsbild mit einer 10-fachen Vergrößerung. Danach wurden 5 Aufnahmen mit einer 40-fachen Vergrößerung mäanderförmig über die Leber verteilt aufgenommen.

Alle mikroskopischen Aufnahmen wurden auf eine hochauflösende Digitalkamera (C4742-95; Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) projiziert und auf einem Standard Computer für off-line Analysen gespeichert.

4.2.8 Intravitalmikroskopische Auswertung

Die komplette Auswertung wurde im off-line Modus von einem zur Therapie verblindeten Untersucher mit einer hochauflösenden Software (SimplePCI, Version 5.3; CompX Inc., Sewickley, Pa, USA) durchgeführt.

4.2.8.1 Hepatische Mikrozirkulation

In jeder 10 s-Videosequenz wurden die perfundierten Sinusoide pro 200 μm (S_p), der sinusoidale Durchmesser (S_D) und die Erythrozytengeschwindigkeit (V_{RBC}) gemessen. Dies erlaubte eine Abschätzung des hepatischen Blutflusses (Volumetric blood flow = VBF) anhand der Formel $VBF = V_{RBC} \times \pi \times (S_D / 2)^2$. Damit konnte mit der Formel $PI_x = S_p \times VBF$ der hepatische Perfusionsindex (PI_x) abgeschätzt werden (vergleiche (BAUER et al., 1995)). Die jeweiligen Messungen wurden anhand von 5 Videosequenzen pro Tier durchgeführt.

(a.) Perfundierte Sinusoide

In einem repräsentativen Bild der Videosequenz wurden mithilfe einer Schablone die Anzahl der Sinusoide, die sich auf einer Strecke von 200 μm in einem Abstand von 100 μm von der Zentralvene befinden, gezählt. In einem weiteren Schritt wurde unter Betrachtung der gesamten Videosequenz evaluiert, durch welche dieser Sinusoide Erythrozyten fließen und somit eine Perfusion stattfindet.

(b.) Durchmesser der Sinusoide

Zur Messung der Durchmesser wurden in einem Bild der Videosequenz an repräsentativen Sinusoiden insgesamt 20 Striche senkrecht zur Flussrichtung von Gefäßwand zu Gefäßwand gezogen und aus ihnen der Mittelwert berechnet.

(c.) Eryflow

In jedem Video wurden 5 Erythrozyten in verschiedenen Sinusoiden ausgewertet. Dazu wurde ein Erythrozyt über eine möglichst lange Bildfolge verfolgt. Der Start- und der Endpunkt der Strecke, die der Erythrozyt durchfließt, wurden senkrecht zur Flussrichtung markiert. Dazu wurde bei beiden Punkten dieselbe Seite des Erythrozyten gewählt. Dann wurden die beiden Bilder miteinander verglichen um eventuelle Veränderungen der Gewebeposition festzustellen und die Markierung entsprechend anzugleichen. Die nun korrekt gekennzeichnete Strecke wurde nun entlang einer Seite des Sinusoids markiert und ausgemessen. Da die Videosequenzen alle mit der gleichen Geschwindigkeit aufgenommen wurden, konnte man anhand der Anzahl der Bilder in der ein Erythrozyt eine bestimmte

Strecke durchläuft, die Geschwindigkeit berechnen. Pro Video wurde ein Mittelwert aus den 5 gemessenen Erythrozyten berechnet.

4.2.8.2 Hepatozellulärer Schaden

Um den hepatozellulären Schaden auszuwerten erfolgte die Zählung der mit Propidiumiodid angefärbten Zellen (PI-positive Zellen) pro Gesichtsfeld.

4.2.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe der Softwarepaketes SigmaStat (SigmaPlot 9.0 with SigmaStat integration, Systat Software, Erkath, Deutschland). Zunächst wurden die Daten mittels Kolmogorov-Smirnow Test auf Normalverteilung überprüft. Bei Normalverteilung wurden die Daten durch eine One Way Analysis of Variance (One Way ANOVA) miteinander verglichen. Bei nicht normalverteilten Daten erfolgte die Analyse mittels Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks (ANOVA on Ranks). Die post-hoc Analyse erfolgte durch einen Student-Newman-Keuls-Test bzw. einem Dunn`s-Test. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgesetzt. Der Verlauf der Vitalparameter wurde mit einer One Way repeated measures Analysis of Variance (One Way RM ANOVA) statistisch ausgewertet. Graphisch wurden die Daten mithilfe des Programms SigmaPlot 9.0 (Systat Software, Erkath, Deutschland) dargestellt. Wobei in den Graphiken bei parametrisch verteilten Daten der Mittelwert \pm Standardabweichung (SD = Standard deviation) oder Mittelwert \pm Standardfehler (SE = Standard error) und bei nicht parametrisch verteilten Daten der Median \pm 95 % Konfidenzintervall angezeigt wird.

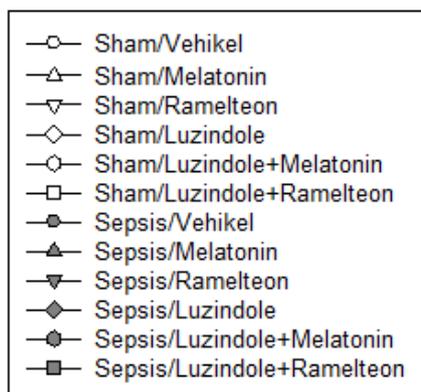
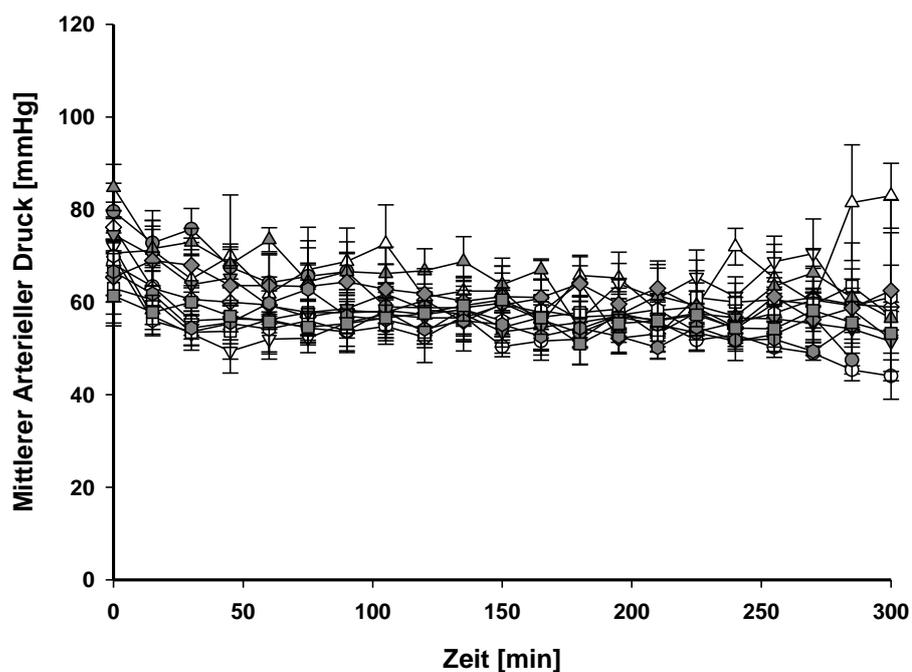
5 ERGEBNISSE

5.1 Vitalparameter

Der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) war zwischen den einzelnen Gruppen vergleichbar. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Messzeitpunkten der verschiedenen Behandlungsgruppen (siehe Abbildung 2).

Die Herzfrequenz der einzelnen Behandlungsgruppen zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied während des Beobachtungszeitraums (siehe Abbildung 2)

Die Körpertemperatur konnte während des Versuchsablaufes auf vergleichbare Werte gehalten werden. So zeigte sich im Intergruppenvergleich kein statistisch signifikanter Unterschied.

**A**

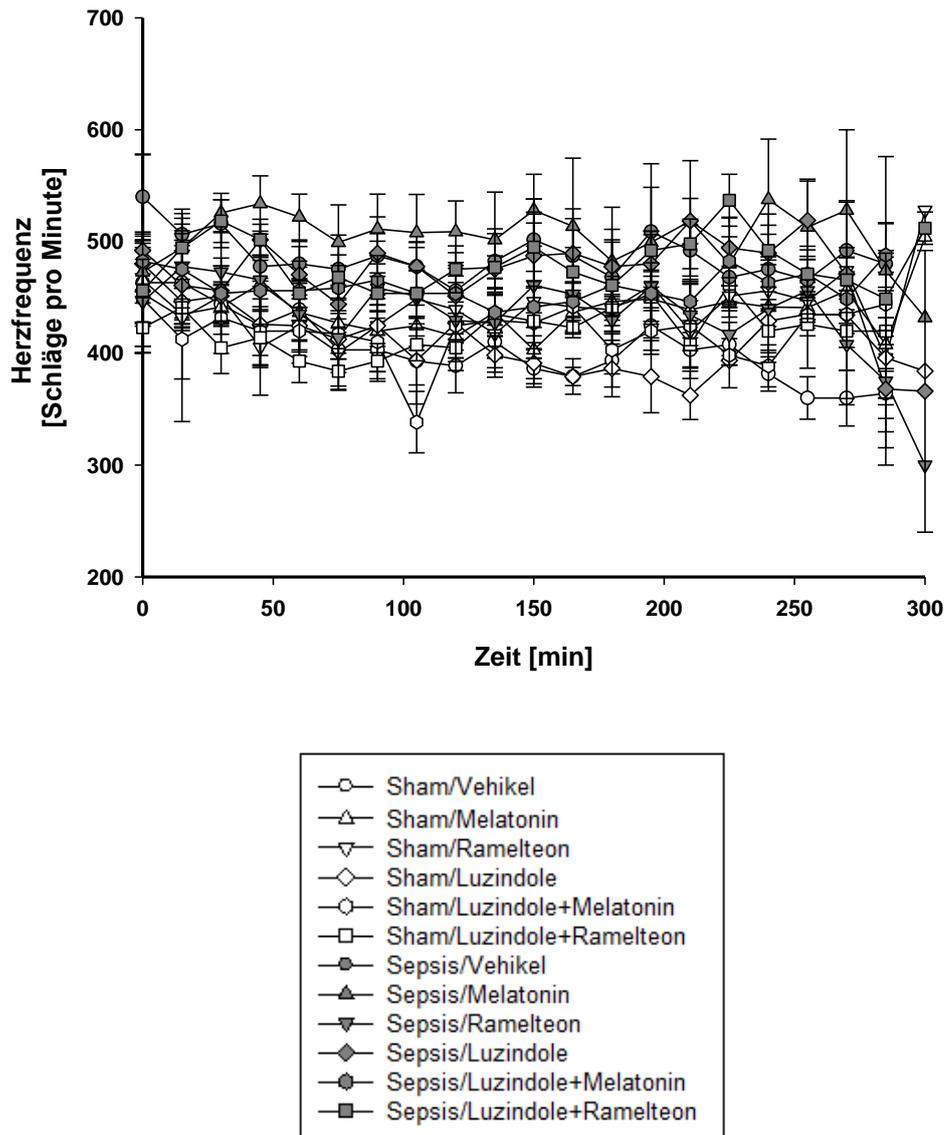


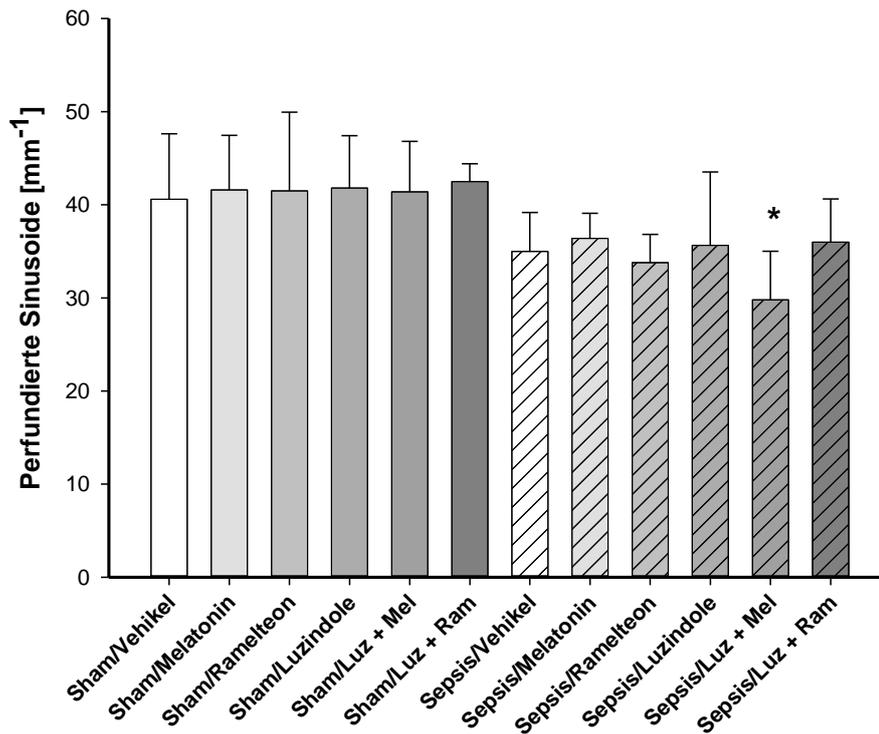
Abbildung 2: Mittlerer arterieller Blutdruck (A) und Herzfrequenz (B) der Versuchsgruppen während des Versuchsablaufs. MAP dargestellt als Mittelwert + Standardfehler. Herzfrequenz dargestellt als Mittelwert + Standardabweichung. (n = 5/Gruppe, Ausnahme Sham/Luz + Ram: n = 4). Sham: scheinoperierte Tiere.

5.2 Sinusoidale Perfusion

Die Anzahl der perfundierten Sinusoide der Sham/Vehikel-Gruppe im Vergleich zur Sepsis/Vehikel-Gruppe zeigte keinen signifikanten Unterschied ($40,6 \pm 7,021 \text{ mm}^{-1}$ vs. $35,0 \pm 4,183 \text{ mm}^{-1}$ ($p = 0,399$)). Eine Monomedikation mit Melatonin, Ramelteon oder Luzindole führte weder in der Sepsis noch bei den Sham-Gruppen zu einer signifikanten Veränderung der perfundierten Sinusoide. Eine Doppelmedikation mit Luzindole und Melatonin führte zu einer Minderung der perfundierten Sinusoide in der Sepsis

(Sepsis/Luz + Mel: $29,8 \pm 5,215\text{mm}^{-1}$). Diese war jedoch nur im Vergleich zu allen Sham-Gruppen statistisch signifikant ($p < 0,05$) und nicht im Vergleich zu anderen Sepsis-Gruppen (siehe Abbildung 3)

Bei der Messung des sinusoidalen Durchmessers der Leber zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Versuchsgruppen ($p = 0,079$) (siehe Abbildung 3)

**A**

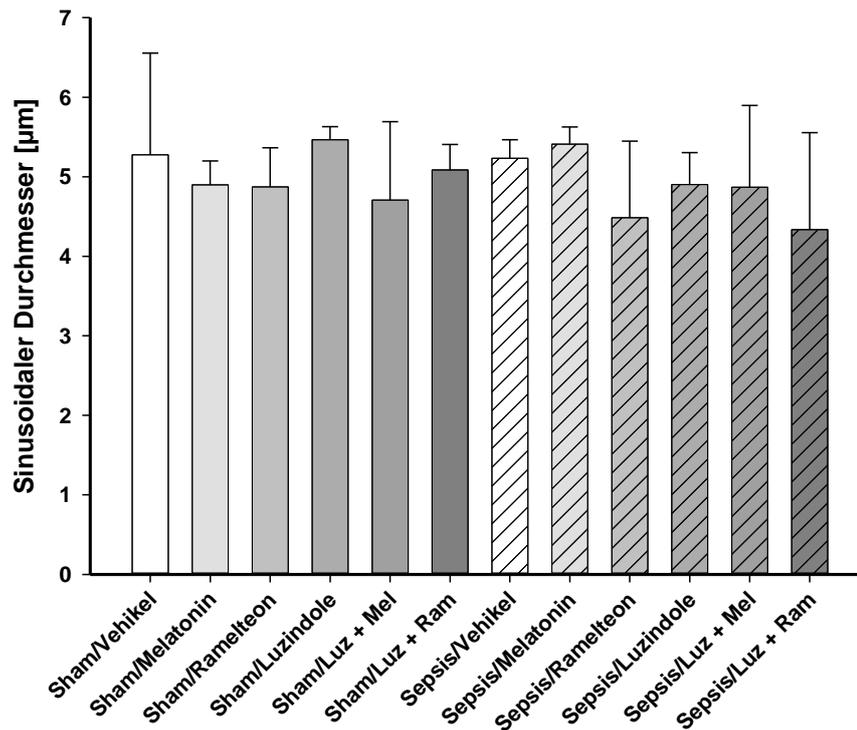
**B**

Abbildung 3: (A) Perfundierte Sinusoide. Die mit (*) gekennzeichnete Gruppe Sepsis/Luz + Mel hat statistisch signifikant weniger perfundierte Sinusoide als alle Sham-Gruppen ($p < 0,05$). (B) Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Sinusoidalen Durchmessern der einzelnen Gruppen ($p = 0,079$). Die Daten sind dargestellt als Mittelwert + Standardabweichung ($n = 5$ /Gruppe, Ausnahme Sham/Luz + Ram: $n = 4$). Sham: scheinoperierte Tiere. Luz: Luzindole, Mel: Melatonin, Ram: Ramelteon

5.2.1 Erythrozytengeschwindigkeit

Die mittlere Erythrozytengeschwindigkeit wurde durch die Sepsisinduktion nicht signifikant beeinflusst (kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Sham/Vehikel ($127,3 \pm 37,0 \mu\text{m/s}$) vs. Sepsis/Vehikel ($182,0 \pm 70,1 \mu\text{m/s}$)). Die Gabe von Melatonin führte sowohl in der Sepsis-Gruppe als auch bei den scheinoperierten Tieren zu einer erhöhten Erythrozytengeschwindigkeit (Sham/Melatonin: $276,6 \pm 74,0 \mu\text{m/s}$, Sepsis/Melatonin: $243,0 \pm 21,0 \mu\text{m/s}$). Diese war jedoch nur gegenüber der Vehikel-Gruppe der scheinoperierten Tiere signifikant erhöht und nicht gegenüber der Vehikel-Gruppe der Sepsis-Tiere. Bei zusätzlicher Gabe von Luzindole zeigte sich eine partielle Antagonisierung des Melatonineffektes (Sham/Luz + Mel: $165,9 \pm 28,4 \mu\text{m/s}$, Sepsis/Luz + Mel: $158,3 \pm 33,3 \mu\text{m/s}$), die das Signifikanzniveau nicht überschritt. Die Gabe von Ramelteon oder Luzindole beeinflusste die Erythrozytengeschwindigkeit im Vergleich zur Vehikel-Gruppe weder bei den scheinoperierten Tieren noch bei den Sepsis-Tieren.

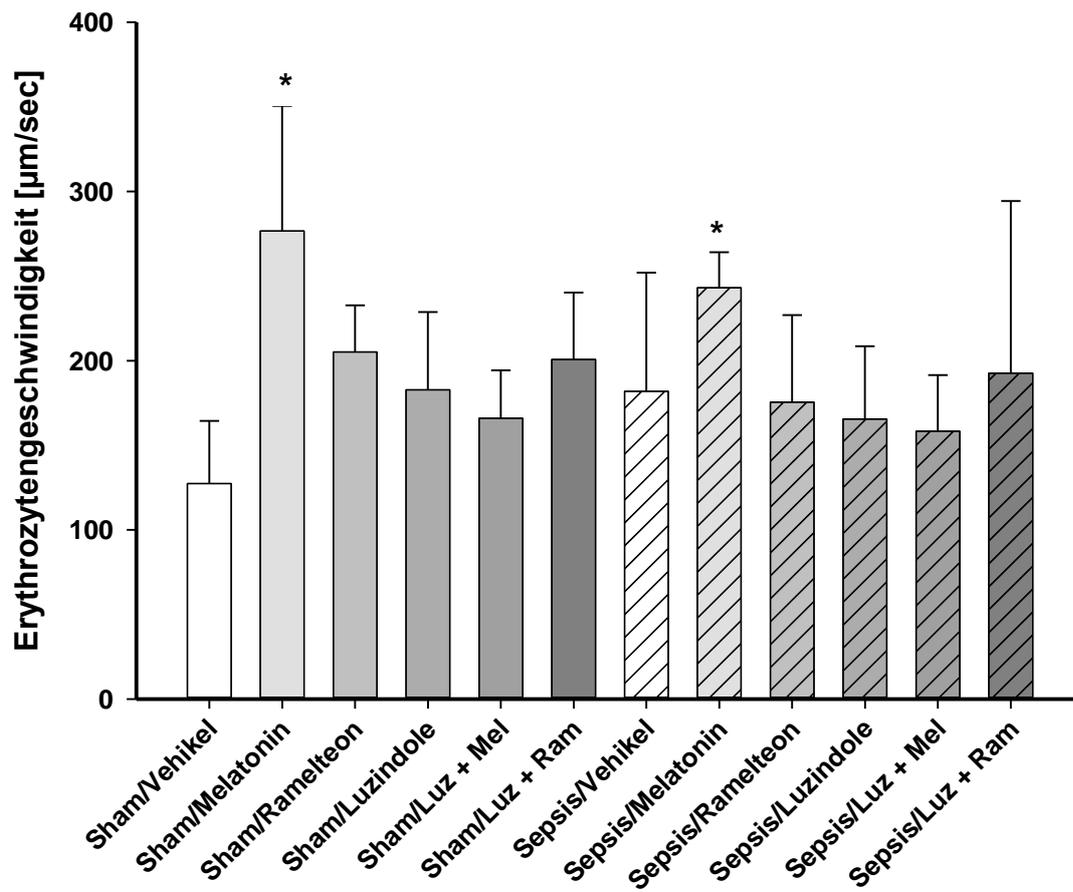


Abbildung 4: Erythrozytengeschwindigkeit. Die mit Stern (*) gekennzeichneten Gruppen Sham/Melatonin und Sepsis/Melatonin haben eine signifikant höhere Erythrozytengeschwindigkeit als die Gruppe der scheinoperierten Vehikel-Gruppe (Sham/Vehikel) ($p < 0,05$). Luz: Luzindole, Mel: Melatonin, Ram: Ramelteon. Sham: scheinoperierte Tiere.

5.2.2 Volumetrischer Blutfluss

Die Sepsis führte zu keiner signifikanten Veränderung des volumetrischen Blutflusses im Vergleich zu scheinoperierten Tieren (Sham/Vehikel ($2,8 \pm 1,1$ pl/s) vs. Sepsis/Vehikel ($4,0 \pm 1,5$ pl/s) ($p = 0,742$)). Eine Melatonintherapie führte in scheinoperierten und septischen Tieren zu einem tendenziell höheren volumetrischen Blutfluss, der allerdings statistisch nicht signifikant war (Sham/Melatonin ($5,1 \pm 1,2$ pl/s) vs. Sham/Vehikel: $p = 0,092$; Sepsis/Melatonin ($5,6 \pm 0,7$ pl/s) vs. Sepsis/Vehikel: $p = 0,216$). Der durch Melatoningabe höhere Blutfluss bei den Sepsis-Tieren ließ sich durch die Zugabe von Luzindole wieder aufheben (Sepsis/Melatonin vs. Sepsis/Luz + Mel ($3,1 \pm 1,4$ pl/s): $p = 0,041$). Die alleinige Gabe von Ramelteon oder Luzindole veränderte den Blutfluss im Vergleich zur Vehikel-Gruppe weder bei den scheinoperierten Tieren noch bei den Sepsis-Tieren.

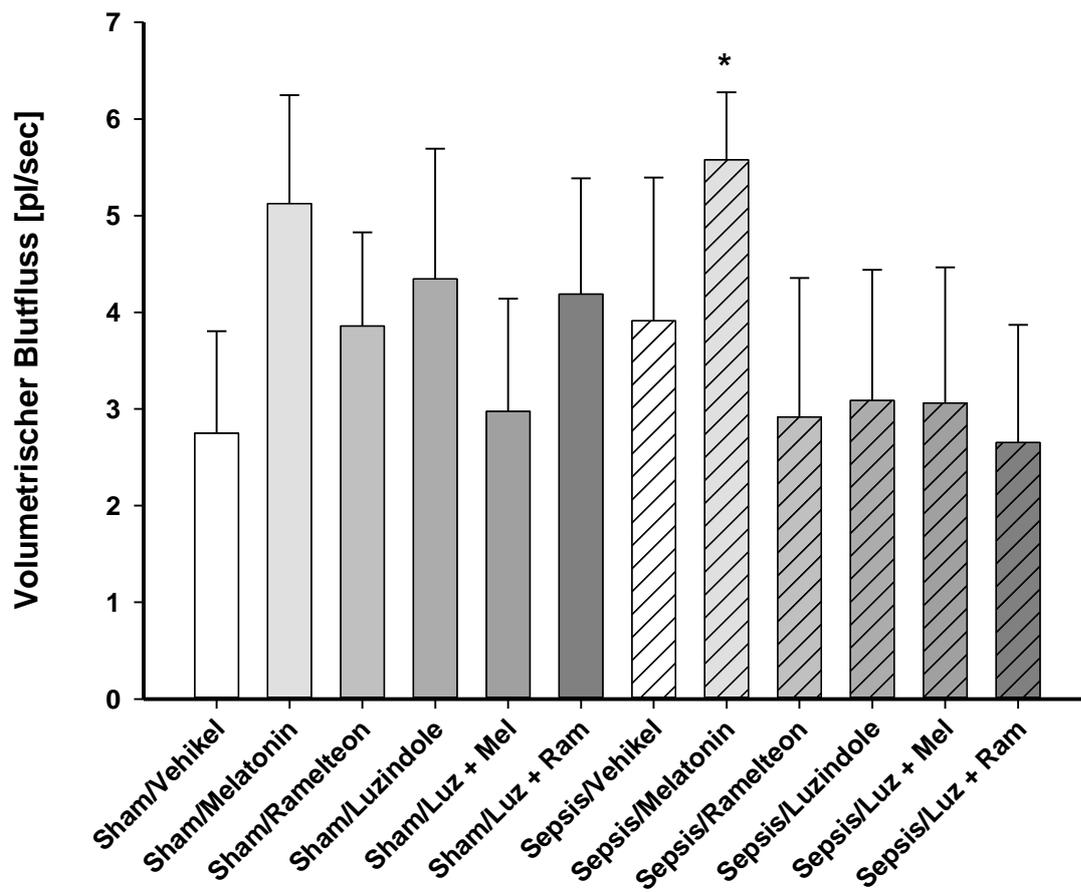


Abbildung 5: Volumetrischer Blutfluss. Der Stern (*) zeigt einen signifikant erhöhten volumetrischen Blutfluss gegenüber den Gruppen Sham/Vehikel, Sham/Luz + Mel, Sepsis/Luzindole, Sepsis/Luz + Mel, Sepsis Ramelteon, Sepsis/Luz + Ram ($p < 0,05$)

5.2.3 Hepatischer Perfusionsindex

Der Hepatische Perfusionsindex war bei den Sham/Vehikel- und den Sepsis/Vehikel-Tieren vergleichbar ($113 \pm 55,7$ vs. $134,3 \pm 40,4$; $p = 0,911$). Es zeigte sich eine statistisch nicht signifikante Tendenz zur Verbesserung des hepatischen Perfusionsindex durch die Gabe von Melatonin im Vergleich zu unbehandelten und scheinoperierten Tieren. (Sham/Melatonin ($209,2 \pm 25,9$) vs. Sham/Vehikel: $p = 0,073$; Sepsis/Melatonin ($204,8 \pm 27,3$) vs. Sepsis/Vehikel: $p = 0,166$). Bei Sepsis-Tieren wurde die Melatoninwirkung durch zusätzliche Gabe von Luzindole aufgehoben (Sepsis/Melatonin vs. Sepsis/Luz + Mel ($94,8 \pm 47,6$): $p = 0,030$). Während die Gabe von Ramelteon und Luzindole zu keiner signifikanten Veränderung des hepatischen Perfusionsindex im Vergleich zu den Vehikel-Tieren führte. Der hepatische Perfusionsindex der Sepsis-Tiere wurde unter Melatonintherapie sogar signifikant besser als unter Ramelteontherapie (Sepsis/Melatonin vs. Sepsis/Ramelteon ($100,3 \pm 53,4$): $p = 0,034$).

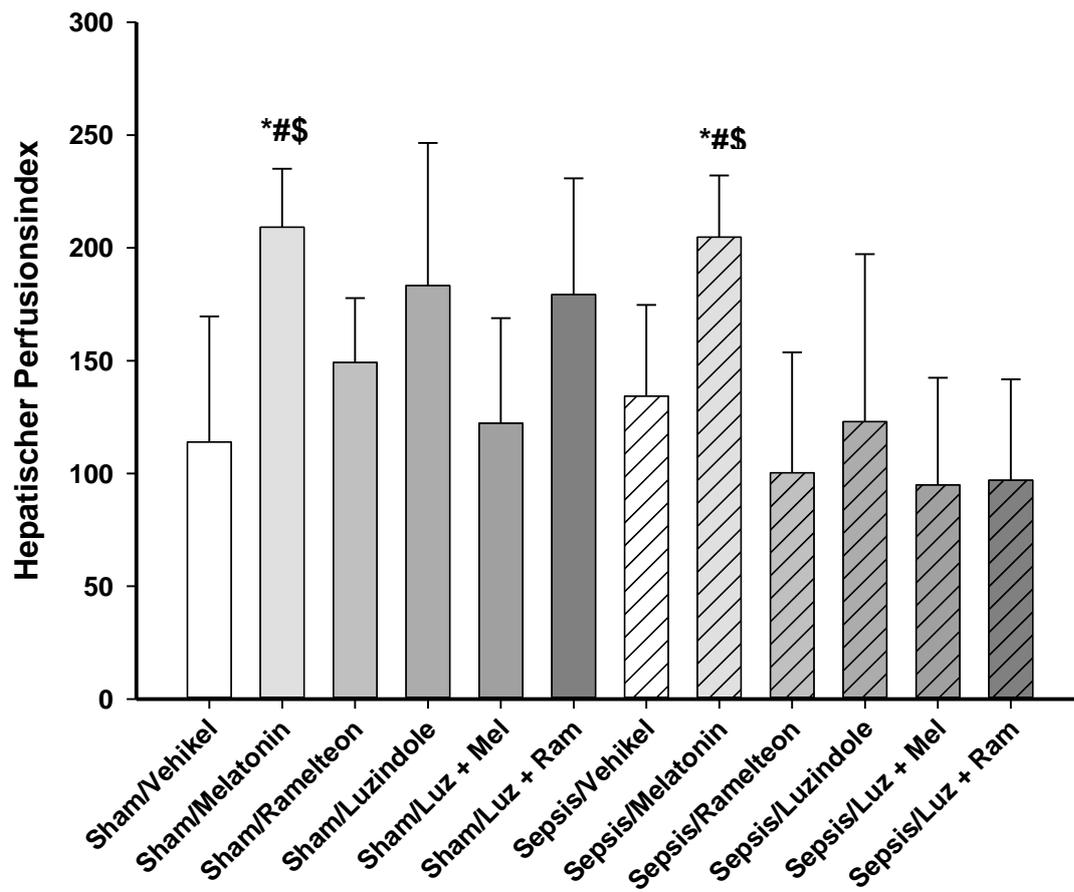


Abbildung 6: Hepatischer Perfusionsindex. Der Stern (*) kennzeichnet eine Signifikanz vs. Sepsis/Ramelteon ($p < 0,05$). (#) kennzeichnet eine Signifikanz vs. Sepsis/Luz + Ram ($p < 0,05$), (\$) kennzeichnet eine Signifikanz vs. Sepsis/Luz + Mel ($p < 0,05$).

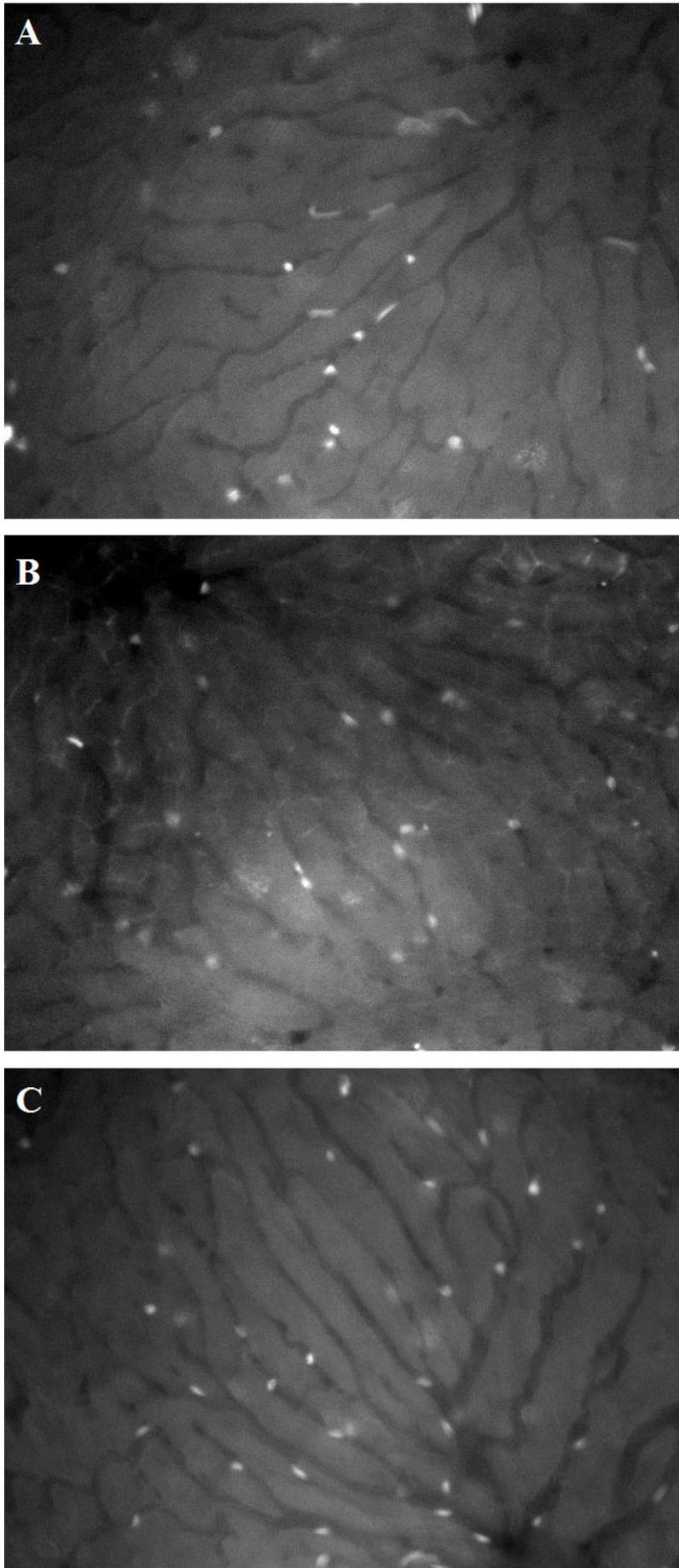


Abbildung 7: Repräsentative Lebersinus: (a) Sham/Melatonin, (b) Sepsis/Vehikel, (c) Sepsis/Melatonin

5.3 Zellschaden

5.3.1 PI-positive Zellen

Der Zellschaden war zwischen den untersuchten Gruppen nicht signifikant unterschiedlich. Betrachtet man die vorliegenden Ergebnisse, zeigte sich eine Tendenz zu einem größeren Zellschaden bei allen Sepsis-Tieren im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren. Insgesamt betrachtet scheint es innerhalb der Gruppen große Schwankbreiten des Zellschadens zu geben. Dies ist vor allem bei den Sepsis-Tieren erkennbar.

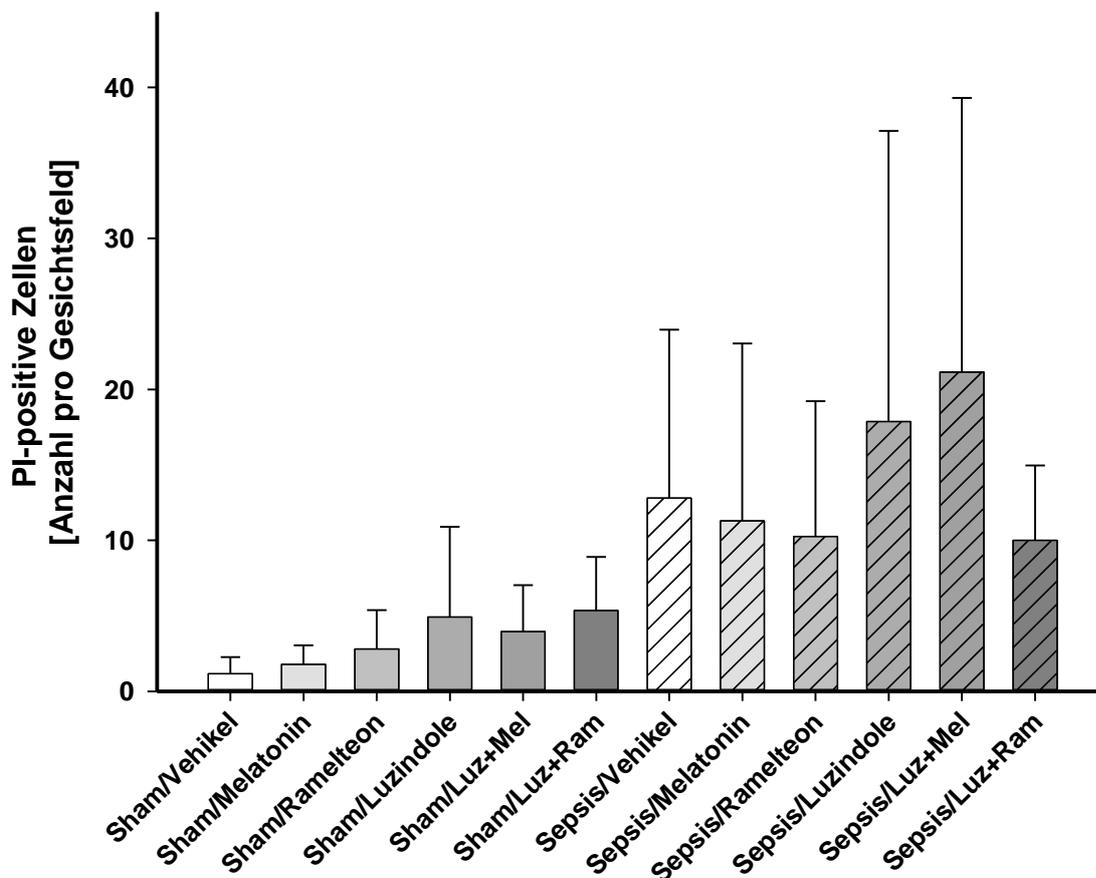


Abbildung 8: PI-positive Zellen als Marker des Zellschadens. Es zeigt sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen. Zu erkennen sind die tendenziell höheren Werte und größeren Schwankbreiten in den Gruppen der Sepsis-Tiere im Vergleich zu den geringen Schwankbreiten der scheinoperierten Tiere.

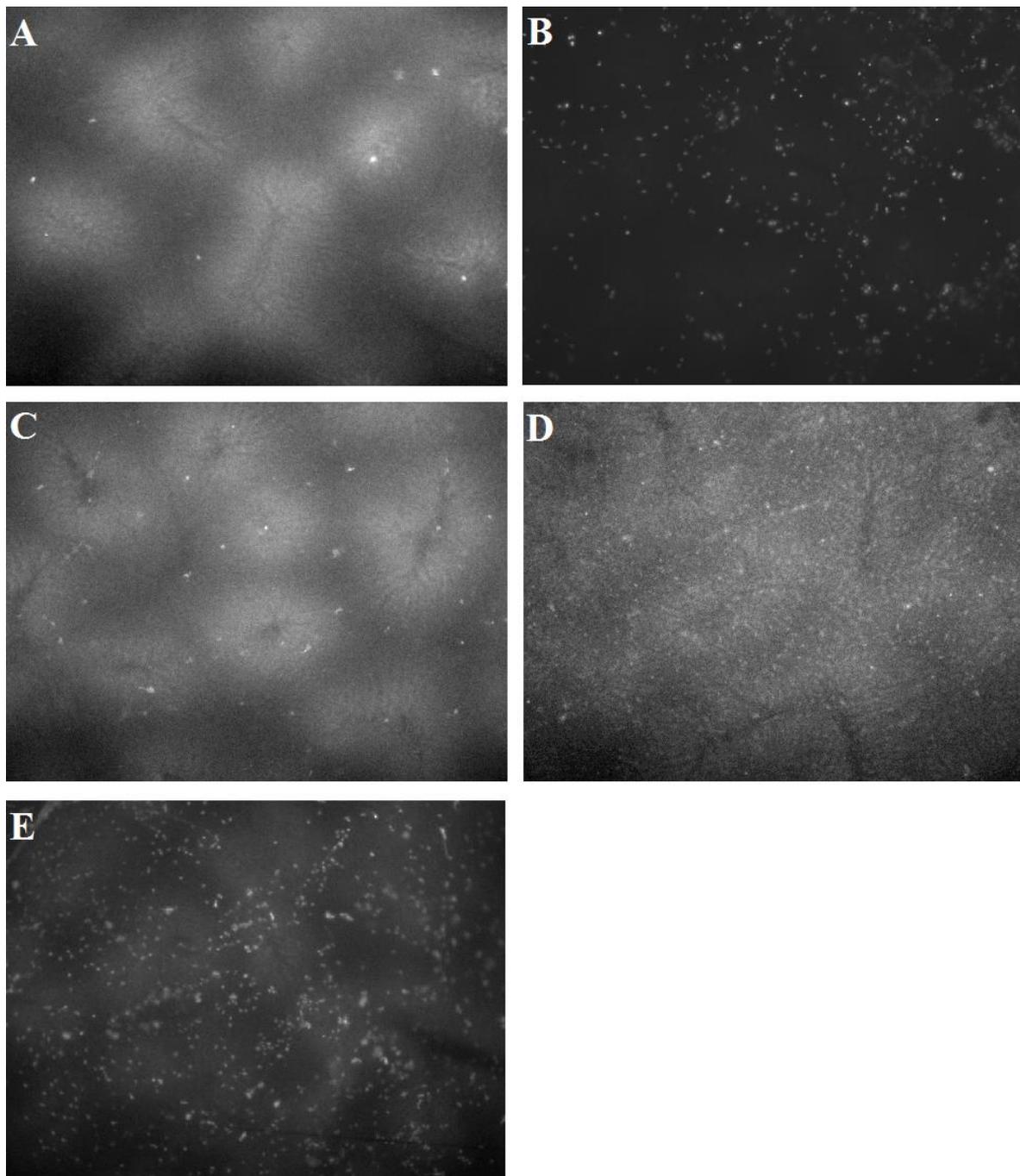


Abbildung 9: Übersichtsaufnahmen der Leber mit Darstellung der PI-positiven Zellen: (a) Sham/Vehikel, (b) Sepsis/Vehikel, (c) Sepsis/Melatonin, (d) Sepsis/Melatonin, (e) Sepsis/Luzindole + Melatonin

6 DISKUSSION

6.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Untersuchung konnten 5 h nach experimentell induzierter Sepsis keine signifikanten Veränderungen der Mikrozirkulation in der Leber der Maus im Vergleich zu scheinoperierten Tieren gefunden werden. Nach Gabe des pinealen Hormons Melatonin zeigte sich nach Sepsis und Scheinoperation eine Erhöhung der Erythrozytenflussgeschwindigkeit und des volumetrischen Blutflusses in der Leber, ohne das Signifikanzniveau zu überschreiten. Diese Erhöhung des Blutflusses ist nach zusätzlicher Gabe des Melatoninrezeptorantagonisten Luzindole nicht mehr nachzuweisen. Der Melatoninrezeptoragonist Ramelteon führt zu keiner signifikant messbaren Veränderung der Mikrozirkulation in der Leber. Nach Induktion einer Sepsis zeigt sich eine Tendenz zu vermehrtem Zellschaden in der Leber unabhängig von der jeweiligen Therapie.

6.2 Hämodynamik

Die hämodynamischen Messparameter sind bei den unterschiedlichen Gruppen des Versuches vergleichbar. Im Untersuchungszeitraum zeigten sich teilweise deutlich niedrigere Werte des MAPs und der Herzfrequenz im Vergleich zu den gemessenen Ausgangswerten. Insgesamt zeigt sich bei Betrachtung der bisher publizierten Normwerte für Labormäuse eine leichte Hypotonie und Bradykardie (MATTSON, 2001). Dies ist am wahrscheinlichsten bedingt durch das Anästhetikum Pentobarbital. Janssen et al. konnten durch Pentobarbital eine Reduktion der Herzfrequenz mit jedoch großen Schwankungsbreiten (MEAN $480 \pm \text{SEM } 47$ Herzschläge pro min) und einem MAP von ca. 60 mmHg bei Mäusen nachweisen (JANSSEN et al., 2004). Diese Reduktion der hämodynamischen Parameter durch Pentobarbital ist vergleichbar mit denen von uns beobachteten Messwerten. Auch die anderen von Janssen et al. untersuchten Anästhetika zeigten eine Reduktion der Herzfrequenz sowie des Herzzeitvolumens. Am stärksten ausgeprägt zeigte sich dies bei Ketamin-Xylazin, gefolgt von Pentobarbital und zuletzt von Isofluran (JANSSEN et al., 2004).

Ein Einfluss der Sepsis auf die Makrozirkulation ist in unserer Studie im untersuchten Zeitraum von 5 h nicht messbar. Diese Beobachtung entspricht nicht den Ergebnissen vorrangigener Untersuchungen. In der Sepsis-Letalitätsstudie von Fink et al. zeigten sich erhebliche Einflüsse auf die Makrozirkulation mit einem medianen Überleben der Sepsis/Vehikel-Mäuse von 390 min mit einem 95 %-Konfidenzintervall von 235 bis 544 min

(FINK et al., 2013a), auf dessen Grundlage der Messzeitpunkt 5 h für die Untersuchung der Leber im Rahmen der Sepsis gewählt wurde.

Betrachtet man die bereits veröffentlichten Daten zur Hämodynamik bei experimentell induzierter Sepsis sieht man, dass die Dauer bis zum Eintritt der hämodynamischen Dekompensation abhängig vom Sepsismodell sowie von der Versuchstierspezies ist. Beim CLP-Sepsismodell bei Ratten fängt diese nach mehreren Stunden bis Tagen an (LANG et al., 1984; WANG et al., 1992). Bei dem von uns verwendeten CLI-Sepsismodell haben Scheiermann et al. bei Ratten eine Reduktion des MAP über den gesamten Versuchsablauf beobachten können, der ab 210 min signifikant zu den Ausgangswerten war. Zudem hatten die Tiere bei Scheiermann et al. eine Mortalitätsrate von 50 % nach 390 min (SCHEIERMANN et al., 2009). In der Studie von Fink et al. war ebenfalls eine kontinuierliche Reduktion der hämodynamischen Parameter bei Ratten und CLI-Sepsis zu erkennen, hier kam es nach 240 min zu einem stärkeren Einbruch des MAPs (FINK et al., 2013a). Die mediane Überlebensrate von unbehandelten Sepsis-Tieren liegt für Ratten hier bei 303 min und für Mäuse bei 390 min.

In unserer Studie wurden im Vergleich zur vorangegangenen Letalitätsstudie nur die Tiere untersucht, welche bis zum Messzeitpunkt 5 h überlebt haben. Ein Grund für die diskrepanten Ergebnisse könnte daher sein, dass die von uns untersuchten Tiere sich noch in der hämodynamisch stabilen Phase der Sepsis befinden.

Melatonin, Ramelteon und Luzindole zeigen in der vorliegenden Studie keinen Einfluss auf die Makrozirkulation.

6.3 Mikrozirkulation

6.3.1 Einfluss der Sepsis auf die Mikrozirkulation

Die Leberfunktionsstörung ist ein prognostisch wichtiger Faktor in der Sepsis (KRAMER et al., 2007). Eine Sepsis assoziierte Leberdysfunktion kann dabei, wie bereits im Vorfeld beschrieben, durch unterschiedliche Ursachen bedingt sein (siehe 3.1.3.5 Pathogenese des Leberversagens). Für den vorliegenden Versuchsaufbau wurde auf Grundlage vorausgegangener Letalitätsuntersuchung ein Messzeitpunkt gewählt, an dem septisch bedingte hepatische Veränderungen zu erwarten waren.

Mikrozirkulationsstörungen in der Sepsis wurden schon in einer Vielzahl von Studien nachgewiesen. Diese wurden dabei meist anhand der Blutflussgeschwindigkeit, der

Gefäßdichte und dem Anteil perfundierter Sinusoide, sowie dem Heterogenitätsindex, also der Streubreite der Perfusion innerhalb eines Gewebes, gemessen.

In einer Studie von De Backer et al. konnte gezeigt werden, dass in der Sepsis die Mikrozirkulation in der Zunge beim Menschen vermindert ist und dies einen prognostisch negativen Effekt darstellt (DE BACKER et al., 2002). Vor allem auf Ebene der Gefäßdichte war eine signifikante Reduktion zu erkennen mit einer großen lokalen Variabilität. Eine verminderte Anzahl perfundierter Sinusoide beim Menschen in der Sepsis scheint unabhängig von makrohämodynamischen Parametern zu sein (SAKR et al., 2004). Mikrozirkulationsstörungen zeigen sich schon in der frühen Phase der Sepsis und sind mit einem schlechtem Outcome assoziiert (SPANOS et al., 2010). Prognostisch bedeutsam scheinen dabei vor allem die verminderte Gefäßdichte, sowie der erhöhte Heterogenitätsindex und weniger die Blutflussgeschwindigkeit zu sein (EDUL et al., 2012). In einer Studie von Trzeciak et al. hatte neben der erhöhten Heterogenität der Mikrozirkulation jedoch auch die Blutflussgeschwindigkeit wichtigen Voraussagewert für die Letalität (TRZECIAK et al., 2007).

Die Mikrozirkulation in der Leber wurde von Croner et al. bei Ratten mittels Intravitalmikroskopie untersucht. Schon 1 h nach Sepsisinduktion mittels CLP zeigten sich Adhäsionen zwischen Endothel und Thrombozyten. Interaktionen zwischen Leukozyten und Endothel fanden nach 3 bis 5 h statt. Eine hepatische Mikrozirkulationsstörung bemessen an der mittleren Erythrozytengeschwindigkeit war bereits 3 h nach Sepsisinduktion nachweisbar (CRONER et al., 2006).

Betrachtet man in unserer Studie die Anzahl der perfundierten Sinusoide pro mm, so zeigt sich die Tendenz, dass diese im Rahmen der Sepsis vermindert ist. Diese Tendenz passt zu den Ergebnissen von McCurdy, der nach Sepsisinduktion mittels intraperitoneal appliziertem LPS oder auch durch Sepsisinduktion durch CLP bei Mäusen eine verminderte Anzahl an perfundierten Sinusoiden in Prozent nachweisen konnte (MCCURDY et al., 2014). Auch bei der durch Colon ascendens Stent Peritonitis (CASP) induzierten Sepsis zeigte sich eine Verminderung der Anzahl perfundierter Sinusoide bei Mäusen (TRAEGER et al., 2010).

In der vorliegenden Studie konnte keine signifikante Veränderung der Mikrozirkulation nach 5 h CLI-Sepsis in der Leber der Maus nachgewiesen werden. Vorausgegangene Untersuchungen zeigen nach 5 h CLI-Sepsis bei der Ratte eine signifikante Reduktion des hepatischen Blutflusses, des hepatischen Perfusionindexes sowie der hepatozellulären Integrität (FINK et al., 2013b).

Eine mögliche Ursache für die Diskrepanz der Ergebnisse könnte die große Variabilität der gemessenen hepatischen Blutflüsse sein. Auch die aufgeführten Daten von Fink et al. weisen bei annähernd gleicher Gruppengröße eine gewisse Schwankungsbreite der hepatischen Blutflüsse auf, was nicht zuletzt an dem gewählten kliniknahen Sepsismodell und der unterschiedlichen Ausprägung der Sepsis zum Untersuchungszeitpunkt liegen könnte. Bei kritischer Wertung der eigenen Studienergebnisse zeigt sich im gewählten Mausmodell eine mediane Überlebenszeit von 390 min mit einem 95 % Konfidenzintervall von 235 bis 544 min. Für das gleiche Studiendesign bei Sprague-Dawley Ratten ist die mediane Überlebenszeit mit 303 min vergleichbar. Bei dieser zeigt sich eine deutlich geringere Streubreite mit einem Konfidenzintervall von nur 250 bis 345 min, was die divergenten Ergebnisse zwischen den vorausgegangenen und unserer Untersuchung erklären könnte.

Wie in den aufgeführten Studien bereits beschrieben, ist ein häufig beobachtetes Kriterium in der Sepsis der vergrößerte Heterogenitätsindex, der von uns allerdings nicht untersucht wurde (DE BACKER et al., 2002; TRZECIAK et al., 2007). Die hohen Schwankungsbreiten innerhalb der Sepsis-Gruppen weisen darauf hin, dass dieser auch hier erhöht sein könnte. Somit wäre die Messung des Heterogenitätsindex ein sinnvoller Ansatz, um Unterschiede zwischen Sepsis und scheinoperierten Tieren zu detektieren.

6.3.2 Einfluss der Melatoninrezeptoraktivierung auf die Mikrozirkulation

6.3.2.1 Melatoninwirkung auf Gefäße

Die Wirkung von Melatonin auf Gefäße wurde bisher in einigen Studien untersucht und es wurde sowohl eine vasodilatatorische Wirkung (SATAKE et al., 1991; WEEKLEY, 1991; DOOLEN et al., 1998), als auch eine vasokonstriktorische Wirkung (EVANS et al., 1992; TING et al., 1997; DOOLEN et al., 1998) beschrieben. Diese war abhängig von den untersuchten Gefäßen, so zeigten sich vasokonstriktorische als auch vasodilatatorische Effekte im selben Gefäß, abhängig von der jeweiligen Rezeptoraktivierung. Eine MT-1-Rezeptoraktivierung führt zu einer Vasokonstriktion und eine MT-2-Rezeptoraktivierung zu einer Vasodilatation in der Kaudalarterie von Ratten (DOOLEN et al., 1998; MASANA et al., 2002). Auch vorrausgehend applizierte Medikamente scheinen einen Einfluss auf die Wirkung von Melatonin auf Gefäße zu haben (WEEKLEY, 1991). In den Koronararterien von Schweinen konnte durch Tunstall et al. beispielsweise eine MT-2-rezeptorabhängige Hemmung der NO-vermittelten Vasodilatation nachgewiesen werden (TUNSTALL et al., 2011). In der Aorta von Ratten hingegen kann

Melatonin eine durch Nitroglycerin induzierte Vasodilatation potenzieren (SATAKE et al., 1991).

Auch in der Sepsis hat Melatonin Einfluss auf das Gefäßsystem. So führt es zu einer verminderten Hyporeaktivität des Gefäßsystems auf Noradrenalin bei Ratten und kann daher eine sepsisbedingte Hypotension verringern (WU et al., 2008). Somit scheint die Wirkung von Melatonin auf Gefäße sehr komplex und abhängig von den jeweiligen Gefäßen und der Melatoninrezeptorexpression zu sein.

6.3.2.2 Melatoninwirkung auf die Mikrozirkulation

Eine Beeinflussung der Mikrozirkulation der Leber kann durch direkte Wirkung auf intrahepatische Gefäße, durch Veränderung des Herzzeitvolumens oder durch eine regionale Umverteilung bedingt sein.

Auf mikrozirkulatorischer Ebene gibt es eine gute Datenlage dafür, dass Melatonin die Perfusion verbessert. So konnte von Mathes et al. eine Verbesserung des hepatischen Perfusionsindex nach hämorrhagischem Schock bei Ratten gezeigt werden (MATHES et al., 2008c). Dies scheint rezeptorabhängig zu sein, da dieser Effekt durch den Melatoninrezeptorantagonisten Luzindole aufhebbar ist. Im Rahmen des obstruktiven Schlafapnoesyndroms kommt es durch intermittierende Hypoxie zu Mikrozirkulationsstörung. Bertuglia et al. konnten zeigen, dass diese Mikrozirkulationsstörung durch Melatonin verringert wurde, gemessen an dem Kapillardurchmesser von Hamsterwangentaschen, wobei hier von einer antioxidativen Wirkung durch Melatonin ausgegangen wird (BERTUGLIA, REITER, 2009). Nach prolongierter Ischämie scheint Melatonin zu einer verbesserten Mikrozirkulation, bemessen an dem Kapillardurchmesser und der Perfusion im Musculus cremaster der Ratte, zu führen (WANG et al., 2005). Auch im Rahmen einer Endotoxämie zeigt Melatonin positive Effekte auf die Mikrozirkulation. Dies konnten Liaw et al. an der Beeinflussung der Blutflussgeschwindigkeit und der Leukozytenadhäsion im Magen von Ratten nachweisen (LIAW et al., 2002).

In unserer Studie führt Melatonin zu keiner signifikanten Veränderung der Anzahl der perfundierten Sinusoide oder des sinusoidalen Durchmessers. Somit scheint ein Einfluss auf intrahepatische Gefäße unwahrscheinlich.

Es ist jedoch eine Tendenz zu erkennen, dass sich aufgrund einer erhöhten Erythrozytenflussgeschwindigkeit der hepatische Perfusionsindex verbessert. Ursache hierfür könnte ein verbessertes Herzzeitvolumen bei gleichen hämodynamischen Parametern sein,

welches von uns nicht untersucht wurde. In vitro Studien von Mei et al. an Herzen embryonaler Küken weisen darauf hin, dass Melatonin das kardiale Schlagvolumen erhöht (MEI et al., 2001). Zur genaueren Untersuchung der Melatoninwirkung scheint in weiteren Studienansätzen ein erweitertes Monitoring mit Messung des Herzzeitvolumens und des peripheren Gefäßwiderstandes sinnvoll zu sein.

6.3.2.3 Rezeptorabhängigkeit der Melatoninwirkung auf die Mikrozirkulation

Der beobachtete Effekt einer erhöhten Erythrozytenflussgeschwindigkeit nach Melatoningabe scheint durch den Rezeptorantagonisten Luzindole antagonisierbar zu sein, was auf einen rezeptorabhängigen Mechanismus hinweist. Allerdings zeigt sich keine Erhöhung des hepatischen Perfusionsindex durch den Melatoninrezeptoragonisten Ramelteon. Dies spricht eher gegen eine rezeptorabhängige Wirkung, insbesondere da Ramelteon sowohl für den MT-1-Rezeptor als auch für den MT-2-Rezeptor eine höhere Affinität als Melatonin besitzt.

In unserem Fall könnte eine Aufhebung der Wirkung von Melatonin auf den hepatischen Perfusionsindex durch Luzindole für eine MT-2-rezeptorabhängige Wirkung sprechen, da Luzindole eine 25-mal höhere Affinität zum MT-2-Rezeptor als zum MT-1-Rezeptor besitzt (DUBOCOVICH et al., 1998). Eine MT-2-vermittelte Vasodilatation präsinusoidaler Gefäße oder MT-2-vermittelte Erhöhung des Herzzeitvolumens könnte die Ursache des höheren hepatischen Perfusionsindex sein.

Ramelteon hat eine höhere Affinität zu den Melatoninrezeptoren als Melatonin selbst. Die Affinität zum MT-1-Rezeptor ist stärker ausgeprägt als zum MT-2-Rezeptor. Es könnte also sein, dass eine MT-1-vermittelte Vasokonstriktion die MT-2-rezeptorabhängige Vasodilatation überwiegt und somit kein Effekt durch Ramelteon erkennbar ist.

Eine MT-3-vermittelte Veränderung des hepatischen Perfusionsindex würde der Beobachtung entsprechen, dass Melatonin im Gegensatz zu Ramelteon zu einer Verbesserung führt, da Melatonin eine weitaus höhere Affinität zum MT-3-Rezeptor besitzt als Ramelteon. Dass Luzindole die durch Melatonin vermittelte Veränderung des hepatischen Perfusionsindex wieder aufhebt, ist mit der Erklärung allerdings nicht in Einklang zu bringen, da Luzindole kein Ligand für den MT-3-Rezeptor darstellt (NOSJEAN et al., 2001).

Häufig wurden die positiven Eigenschaften von Melatonin seinen antioxidativen Eigenschaften zugeschrieben. In dem vorliegenden Fall ist dies sehr unwahrscheinlich, da die Tendenz der Verbesserung des hepatischen Perfusionsindex durch Luzindole antagonisierbar

ist. Da Luzindole selbst antioxidativ wirksam ist, müsste, wenn die Ursache der Melatonin Wirkung auf den antioxidativen Eigenschaften beruhen würde, durch Zugabe von Luzindole der Effekt noch deutlicher oder zumindest gleich ausfallen.

Eine Rezeptorabhängigkeit des tendenziell verbesserten hepatischen Perfusionsindexes kann mit der vorliegenden Studie nicht abschließend geklärt werden. Daher scheint ein sinnvoller Ansatz die Untersuchung der hepatischen Mikrozirkulation anhand von Melatoninrezeptor-Knock-out-Tieren zu sein.

6.4 Zellschaden

6.4.1 Einfluss der Sepsis auf den Zellschaden

In der Sepsis kommt es zu einem vermehrten Zelluntergang durch Nekrose und Apoptose. Die Apoptose kann durch einen intrinsischen und einen extrinsischen Weg hervorgerufen werden (siehe Einleitung Abschnitt 3.1.3.3 Pathogenese der Organdysfunktion) und wird in der Sepsis in multiplen Organen, unter anderem der Leber, beobachtet (HOTCHKISS et al., 1999). Bei Mäusen zeigte sich nach Sepsisinduktion mittels CASP-induzierter Sepsis nach 12 h eine signifikant erhöhte hepatische Apoptoserate (TRAEGER et al., 2010). Fink et. al konnten bei Ratten 5 h nach Sepsisinduktion mittels CLI bei unbehandelten Tieren ein signifikant größeren Zellschaden in der Leber nachweisen als bei scheinoperierten Tieren (FINK et al., 2013b). Hierbei wurde der Zellschaden anhand von PI-positiven Zellen untersucht. In der vorliegenden Studie zeigte sich die Tendenz einer vermehrten Nekrose in der Leber 5 h nach Sepsisinduktion. Diese Tendenz überschreitet das Signifikanzniveau nicht, was daran liegen könnte, dass das von uns gewählte Sepsismodell eine sehr große Variabilität in der Ausprägung der Sepsis zum Untersuchungszeitpunkt aufweist.

Bereits von Lustig et al. wurde postuliert, dass Studien zur „integrierten Organfunktion in Ratten aufgrund anatomischer Gründe einfacher durchzuführen und weniger anfällig für Fehler sind als bei Mäusen“ (LUSTIG et al., 2007). Sicherlich könnte die Maus als variabler Faktor dazu führen, dass bei Ratten klar erkennbare Ergebnisse bei Mäusen nicht so deutlich darzustellen sind. Um diese Hypothese zu belegen, müssten noch weiterführende Studien zum direkten Vergleich von Mäusen und Ratten im Rahmen der Sepsis durchgeführt werden.

6.4.2 Einfluss von Melatonin auf den Zellschaden

Für Melatonin konnte ein Einfluss auf den Zellschaden in verschiedenen Organen, sowohl die Apoptose als auch die Nekrose betreffend, nachgewiesen werden. So führte Melatonin beispielsweise zu einer verminderten Apoptose von Immunzellen von beispielsweise

Menschen oder Nagetieren (SAINZ et al., 1995; YU et al., 2000; LARDONE et al., 2009), und neuronalen Zellen von Mäusen (SHEN et al., 2002b), sowie im Pankreas von Ratten (MUNOZ-CASARES et al., 2006), oder in der Milz von Mäusen (CARRILLO-VICO et al., 2005b).

Auch auf die Apoptoserate von Hepatozyten konnte in verschiedenen Stressmodellen ein positiver Effekt durch Melatonin nachgewiesen werden. Hierzu zählen Studien zu hepatotoxischen Agenzien wie Cyclosporin A bei Ratten (KURUS et al., 2009) und Acetaminophen bei Mäusen (LIANG et al., 2012), wobei Melatonin jeweils zu einer verminderten Apoptoserate führte. Auch im Rahmen von Ischämie- und Reperusionsmodellen konnte für Melatonin ein positiver Effekt auf den Zellschaden aufgezeigt werden. So bewirkt Melatonin eine verminderte Apoptose und eine Verbesserung der Leberfunktion nach Ischämie- und Reperfusion im Rahmen einer Lebertransplantation bei Ratten mit Fettlebern (KIREEV et al., 2013). Zudem führte in der Studie von Kim et al. Melatonin neben der geringeren Apoptoserate auch zu einer Reduktion der Nekrose in der Leber nach Ischämie und Reperfusion bei Ratten. Die Nekrose-Ausdehnungsrate wurde hierbei zum einen histologisch bemessen, zum anderen durch die Höhe der GPT-Konzentration festgestellt (KIM, LEE, 2008). Auch im Rahmen von infektiösen Stressmodellen zeigte Melatonin einen protektiven Effekt. So kommt es durch Melatonin bei Ratten, welche mit D-Galactosamin vorbehandelt wurden, nach LPS-Injektion zu einem vermindertem Zellschaden, bemessen an der Apoptoserate und der GPT-Serumkonzentration (WANG et al., 2007).

Studien zur Wirkung von Melatonin auf die Leberzellnekrose wurden beispielsweise anhand von Amöbeninfektion bei Nagetieren (FRANCA-BOTELHO et al., 2011), Tetrachlormethanvergiftung bei Ratten (ARANDA et al., 2010), und im Rahmen der akuten Pankreatitis bei Ratten durchgeführt (ESREFOGLU et al., 2008). In den jeweiligen hepatotoxischen Modellen zeigte sich eine verminderte Nekroserate durch Melatonin.

Im Rahmen des hämorrhagischen Schocks konnten Mathes et al. bei Ratten eine Verminderung PI-positiver Zellen und somit der Nekrose in der Leber durch Melatonin und dem Melatoninrezeptoragonisten Ramelteon nachweisen, was auf einen melatoninrezeptorvermittelten Effekt hinweist (MATHES et al., 2008b; MATHES et al., 2008c). Durch Luzindole war dies jedoch nicht antagonisierbar.

In unserer Studie wurde mittels PI-positiver Zellen der Einfluss von Melatonin auf die Nekroserate in der Leber in der Sepsis untersucht. Konträr zu den vorliegenden Studien wurde

von uns keine Beeinflussung auf die intrahepatische Nekrose durch Melatonin gesehen. Ursache hierfür könnte die oben im Abschnitt 6.4.1 beschriebene große Variabilität innerhalb der Gruppen sein, welche die Untersuchung von Medikamenteneinflüssen schwierig macht. Auch die Gabe von Ramelteon oder Luzindole ergab keine signifikante Veränderung der Nekroserate.

Interessant bleibt die Frage, ob Melatonin einen Einfluss auf die Apoptose in der Sepsis hat, da die Apoptose einen wichtigen pathophysiologischen Faktor im Rahmen des septischen Geschehens darstellt.

6.5 Grenzen der Studie

Da in unserer Studie der Einfluss der Sepsis auf die Mikrozirkulation nicht stark ausgeprägt ist, ist im vorliegenden Modell eine Interpretation von Medikamenteneinflüssen schwierig.

Ursache der fehlenden Signifikanzen bezogen auf die Sepsis ist sicherlich zum einen das inhomogene jedoch kliniknahe Sepsismodell mit unterschiedlicher Ausprägung der Sepsis zum Untersuchungszeitpunkt. Im Gegensatz beispielsweise zum hämorrhagischen Schock mit einmaliger Schädigung, kommt es hier zur kontinuierlichen Schädigung der Leber, welche sehr heterogen und somit schwieriger vergleichbar ist.

In der vorliegenden Studie haben wir ein Sepsismodell gewählt, welches durch einen akuten Beginn, hohe Mortalität und Erfüllung der Sepsiskriterien gekennzeichnet ist (SCHEIERMANN et al., 2009). Wichtig war bei der Auswahl ein Modell zu wählen, welches so gut wie möglich die pathophysiologischen Vorgänge im Bereich der Hämodynamik und der metabolischen Veränderungen der humanen Sepsis widerspiegelt. Nachteil dieses Modells ist, dass dadurch dass die Grundlage der Sepsisinduktion eine chirurgische Prozedur ist, bei der es zum Austritt einer unklaren und nicht kontrollierbaren Menge an Bakterien in die Bauchhöhle kommt, dieses Modell nur begrenzt steuerbar ist. Daher resultieren unterschiedliche Ausprägungen der Sepsis zu einem bestimmten Zeitpunkt. Diese Heterogenität könnte erklären, warum wir in der vorliegenden Studie im Gegensatz zu vorausgegangenen Studien keinen Einfluss der Sepsis auf die Makro- und Mikrozirkulation sehen.

In der Vergangenheit sind häufig Studien zur Untersuchung der Sepsis mittels Gabe von Endotoxin durchgeführt worden. Vorteil hiervon ist die gute Steuerbarkeit, da eine relativ reine Substanz in einer klaren Menge intravenös injiziert werden kann und somit ein einheitliches Krankheitsbild geschaffen werden kann. Allerdings sind die durch das

Endotoxin induzierten metabolischen und hämodynamischen Vorgänge nicht vergleichbar mit denen der Sepsis (WICHTERMAN et al., 1980). So kommt es nach Injektion von Endotoxin zunächst zu einer peripheren Vasokonstriktion mit vermindertem kardialen Output, wohingegen die Sepsis durch eine Verminderung des peripheren Widerstandes mit erhöhtem kardialen Output charakterisiert ist. Weitere Erkenntnisse zeigen zwar, dass bei geringeren Mengen von infundiertem Endotoxin die hämodynamischen Veränderungen denen der Sepsis entsprechen, allerdings kommt es eher zu einem langsamen Krankheitsverlauf (FINK, HEARD, 1990).

Eine andere, gut steuerbare Methode ist die Injektion von Bakterien. Allerdings simuliert eine schnell Injektion von Bakterien nicht die klinische Situation einer Sepsis, da es zu einer Überflutung von Bakterien kommt und der septische Patient meist nicht mit dieser Masse an Bakterien konfrontiert wird (WICHTERMAN et al., 1980). Dem Körper bleibt hierbei keine Zeit zur Etablierung der bei einer Sepsis hervorgerufenen Abwehrmechanismen. Wenn die Injektion über einen längeren Zeitraum in geringerer Dosierung verläuft, spiegelt das insofern die klinische Situation nicht wieder, als dass es dem Körper nicht möglich ist einen septischen Fokus zu isolieren. Somit entspricht auch die intravenöse Injektion von Bakterien, obwohl gut steuerbar, nicht den klinischen Gegebenheiten eines septischen Patienten (WICHTERMAN et al., 1980).

Es gibt noch weitere Sepsismodelle, wie beispielsweise das CLP-Sepsismodell oder die Implantation von Faeces in die Bauchhöhle, welche alle Vor- und Nachteile haben. Letztlich hatten wir uns aufgrund der Kliniknähe und der Fulminanz des CLI-Sepsismodells hierfür entschieden.

Ein weiterer Punkt, der als Variable für die großen Schwankungsbreiten der Ergebnisse verantwortlich sein könnte ist das Versuchstier Maus.

Im Vergleich zu Mäuseversuchen scheint das CLI-Sepsismodell mit intravitalmikroskopischer Messung bei Ratten stabilere Bedingungen zu bieten (FINK et al., 2013a). Dies stimmt auch mit der Aussage von Lustig et al. überein, dass Studien zur „integrierten Organfunktion in Ratten aufgrund anatomischer Gründe einfacher durchzuführen und weniger anfällig für Fehler sind als bei Mäusen“ (LUSTIG et al., 2007). Das Ziel dieser tierexperimentellen Studie war es, Grundlagen im Verständnis der Melatoninwirkung zu erforschen, mit der Absicht, diese Erkenntnisse für fortführende klinische Studien am Menschen und Entwicklung neuer Medikamente in der Sepsistherapie zu verwenden. Neuere Erkenntnisse von Seok et al. im Bereich der tierexperimentellen Forschung zeigen aber, dass die inflammatorische Reaktion

von Mäusen nicht mit denen der Menschen zu vergleichen ist (SEOK et al., 2013). Somit ist eine Übertragung der hier gewonnenen Erkenntnisse zur Melatoninwirkung auf den Menschen nur bedingt möglich, sodass es zu hinterfragen gilt, ob weiterführende Forschung im Bereich der Sepsis anhand des Mäuseversuchsmodells sinnvoll erscheinen.

Zusammenfassend kann man folgende Schlüsse aus dieser Arbeit ziehen:

Die Frage nach der Wirkung von Melatonin auf die Mikrozirkulation der Leber in der experimentell induzierten Sepsis, untersucht anhand des hepatischen Perfusionsindex und der Erythrozytengeschwindigkeit, kann aufgrund unzureichender Einflüsse der Sepsis auf die hepatische Mikrozirkulation nicht beantwortet werden.

Da in der vorliegenden Studie die Sepsis nur tendenziell zu einer vermehrten Nekrose in der Leber 5 h nach Sepsisinduktion führt ohne das Signifikanzniveau zu überschreiten, fehlt auch hier die Grundlage um eine Aussage über die Wirkung Melatonins auf den Zellschaden in der Leber bei Sepsis zu treffen.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Abdel-Razzak Z, Loyer P, Fautrel A, Gautier JC, Corcos L, Turlin B, Beaune P, Guillouzo A (1993) Cytokines down-regulate expression of major cytochrome P-450 enzymes in adult human hepatocytes in primary culture. *Mol Pharmacol* 44:707-715
2. Acuna-Castroviejo D, Reiter RJ, Menendez-Pelaez A, Pablos MI, Burgos A (1994) Characterization of high-affinity melatonin binding sites in purified cell nuclei of rat liver. *J Pineal Res* 16:100-112
3. Agez L, Laurent V, Pevet P, Masson-Pevet M, Gauer F (2007) Melatonin affects nuclear orphan receptors mRNA in the rat suprachiasmatic nuclei. *Neuroscience* 144:522-530
4. Al-Ghoul WM, Herman MD, Dubocovich ML (1998) Melatonin receptor subtype expression in human cerebellum. *Neuroreport* 9:4063-4068
5. Annane D, Sebille V, Charpentier C, Bollaert PE, Francois B, Korach JM, Capellier G, Cohen Y, Azoulay E, Troche G, Chaumet-Riffaud P, Bellissant E (2002) Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock. *JAMA* 288:862-871
6. Antolin I, Rodriguez C, Sainz RM, Mayo JC, Uria H, Kotler ML, Rodriguez-Colunga MJ, Tolivia D, Menendez-Pelaez A (1996) Neurohormone melatonin prevents cell damage: effect on gene expression for antioxidant enzymes. *FASEB J* 10:882-890
7. Aranda M, Albendea CD, Lostale F, Lopez-Pingarron L, Fuentes-Broto L, Martinez-Ballarín E, Reiter RJ, Perez-Castejon MC, Garcia JJ (2010) In vivo hepatic oxidative stress because of carbon tetrachloride toxicity: protection by melatonin and pinoline. *J Pineal Res* 49:78-85
8. Aust S, Thalhammer T, Humpeler S, Jager W, Klimpfinger M, Tucek G, Obrist P, Marktl W, Penner E, Ekmekcioglu C (2004) The melatonin receptor subtype MT1 is expressed in human gallbladder epithelia. *J Pineal Res* 36:43-48
9. Ayoub MA, Couturier C, Lucas-Meunier E, Angers S, Fossier P, Bouvier M, Jockers R (2002) Monitoring of ligand-independent dimerization and ligand-induced conformational changes of melatonin receptors in living cells by bioluminescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* 277:21522-21528
10. Ayoub MA, Levoye A, Delagrangé P, Jockers R (2004) Preferential formation of MT1/MT2 melatonin receptor heterodimers with distinct ligand interaction properties compared with MT2 homodimers. *Mol Pharmacol* 66:312-321
11. Ayuse T, Brienza N, Revelly JP, O'Donnell CP, Boitnott JK, Robotham JL (1995) Alternations in liver hemodynamics in an intact porcine model of endotoxin shock. *Am J Physiol* 268:H1106-1114
12. Barjavel MJ, Mamdouh Z, Raghbate N, Bakouche O (1998) Differential expression of the melatonin receptor in human monocytes. *J Immunol* 160:1191-1197
13. Bateman RM, Sharpe MD, Ellis CG (2003) Bench-to bedside review: microvascular dysfunction in sepsis--hemodynamics, oxygen transport, and nitric oxide. *Crit Care* 7:359-373
14. Bauer I, Bauer M, Pannen BH, Leinwand MJ, Zhang JX, Clemens MG (1995) Chronic ethanol consumption exacerbates liver injury following hemorrhagic shock: role of sinusoidal perfusion failure. *Shock* 4:324-331
15. Bauer M, Brunkhorst F, Welte T, Gerlach H, Reinhart K (2006) [Sepsis. Update on pathophysiology, diagnostics and therapy]. *Anaesthesist* 55:835-845
16. Bautista AP, Meszaros K, Bojta J, Spitzer JJ (1990) Superoxide anion generation in the liver during the early stage of endotoxemia in rats. *J Leukoc Biol* 48:123-128

17. Baykal A, Iskit AB, Hamaloglu E, Guc MO, Hascelik G, Sayek I (2000) Melatonin modulates mesenteric blood flow and TNFalpha concentrations after lipopolysaccharide challenge. *Eur J Surg* 166:722-727
18. Becker-Andre M, Wiesenberg I, Schaeren-Wiemers N, Andre E, Missbach M, Saurat JH, Carlberg C (1994) Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J Biol Chem* 269:28531-28534
19. Ben-Nathan D, Maestroni GJ, Lustig S, Conti A (1995) Protective effects of melatonin in mice infected with encephalitis viruses. *Arch Virol* 140:223-230
20. Bertuglia S, Reiter RJ (2009) Melatonin reduces microvascular damage and insulin resistance in hamsters due to chronic intermittent hypoxia. *J Pineal Res* 46:307-313
21. Bettahi I, Pozo D, Osuna C, Reiter RJ, Acuna-Castroviejo D, Guerrero JM (1996) Melatonin reduces nitric oxide synthase activity in rat hypothalamus. *J Pineal Res* 20:205-210
22. Blanchard B, Pompon D, Ducrocq C (2000) Nitrosation of melatonin by nitric oxide and peroxynitrite. *J Pineal Res* 29:184-192
23. Bochud PY, Calandra T (2003) Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future treatment. *BMJ* 326:262-266
24. Bone RC (1992) American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 20:864-874
25. Boutin JA, Audinot V, Ferry G, Delagrangé P (2005) Molecular tools to study melatonin pathways and actions. *Trends Pharmacol Sci* 26:412-419
26. Brunner P, Sozer-Topcular N, Jockers R, Ravid R, Angeloni D, Fraschini F, Eckert A, Muller-Spahn F, Savaskan E (2006) Pineal and cortical melatonin receptors MT1 and MT2 are decreased in Alzheimer's disease. *Eur J Histochem* 50:311-316
27. Brydon L, Petit L, Delagrangé P, Strosberg AD, Jockers R (2001) Functional expression of MT2 (Mel1b) melatonin receptors in human PAZ6 adipocytes. *Endocrinology* 142:4264-4271
28. Brzozowski T, Konturek PC, Zwirska-Korczała K, Konturek SJ, Brzozowska I, Drozdowicz D, Sliwowski Z, Pawlik M, Pawlik WW, Hahn EG (2005) Importance of the pineal gland, endogenous prostaglandins and sensory nerves in the gastroprotective actions of central and peripheral melatonin against stress-induced damage. *J Pineal Res* 39:375-385
29. Bubenik GA, Brown GM, Grotta LJ (1977) Immunohistological localization of melatonin in the rat digestive system. *Experientia* 33:662-663
30. Burkhardt S, Reiter RJ, Tan DX, Hardeland R, Cabrera J, Karbownik M (2001) DNA oxidatively damaged by chromium(III) and H₂O₂ is protected by the antioxidants melatonin, N(1)-acetyl-N(2)-formyl-5-methoxykynuramine, resveratrol and uric acid. *Int J Biochem Cell Biol* 33:775-783
31. Cardinali DP, Pevet P (1998) Basic aspects of melatonin action. *Sleep Med Rev* 2:175-190
32. Cardinali DP, Rosner JM (1971) Retinal localization of the hydroxyindole-O-methyl transferase (HIOMT) in the rat. *Endocrinology* 89:301-303
33. Caroleo MC, Frasca D, Nistico G, Doria G (1992) Melatonin as immunomodulator in immunodeficient mice. *Immunopharmacology* 23:81-89
34. Carrillo-Vico A, Calvo JR, Abreu P, Lardone PJ, Garcia-Maurino S, Reiter RJ, Guerrero JM (2004) Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. *FASEB J* 18:537-539
35. Carrillo-Vico A, Garcia-Perganeda A, Naji L, Calvo JR, Romero MP, Guerrero JM (2003) Expression of membrane and nuclear melatonin receptor mRNA and protein in the mouse immune system. *Cell Mol Life Sci* 60:2272-2278

36. Carrillo-Vico A, Guerrero JM, Lardone PJ, Reiter RJ (2005a) A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine* 27:189-200
37. Carrillo-Vico A, Lardone PJ, Naji L, Fernandez-Santos JM, Martin-Lacave I, Guerrero JM, Calvo JR (2005b) Beneficial pleiotropic actions of melatonin in an experimental model of septic shock in mice: regulation of pro-/anti-inflammatory cytokine network, protection against oxidative damage and anti-apoptotic effects. *J Pineal Res* 39:400-408
38. Cassina A, Radi R (1996) Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys* 328:309-316
39. Champier J, Claustrat B, Besancon R, Eymin C, Killer C, Jouvet A, Chamba G, Fevre-Montange M (1997) Evidence for tryptophan hydroxylase and hydroxy-indol-O-methyl-transferase mRNAs in human blood platelets. *Life Sci* 60:2191-2197
40. Cheluvappa R, Denning GM, Lau GW, Grimm MC, Hilmer SN, Le Couteur DG (2009) *Pseudomonas aeruginosa* and the hyperlipidaemia of sepsis. *Pathology* 41:615-621
41. Claustrat B, Brun J, Chazot G (2005) The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Med Rev* 9:11-24
42. Cohen J (2002) The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 420:885-891
43. Conti A, Conconi S, Hertens E, Skwarlo-Sonta K, Markowska M, Maestroni JM (2000) Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. *J Pineal Res* 28:193-202
44. Crespo E, Macias M, Pozo D, Escames G, Martin M, Vives F, Guerrero JM, Acuna-Castroviejo D (1999) Melatonin inhibits expression of the inducible NO synthase II in liver and lung and prevents endotoxemia in lipopolysaccharide-induced multiple organ dysfunction syndrome in rats. *FASEB J* 13:1537-1546
45. Croner RS, Hoerer E, Kulu Y, Hackert T, Gebhard MM, Herfarth C, Klar E (2006) Hepatic platelet and leukocyte adherence during endotoxemia. *Crit Care* 10:R15
46. Currier NL, Sun LZ, Miller SC (2000) Exogenous melatonin: quantitative enhancement in vivo of cells mediating non-specific immunity. *J Neuroimmunol* 104:101-108
47. Darlington GJ, Wilson DR, Lachman LB (1986) Monocyte-conditioned medium, interleukin-1, and tumor necrosis factor stimulate the acute phase response in human hepatoma cells in vitro. *J Cell Biol* 103:787-793
48. de Almeida EA, Martinez GR, Klitzke CF, de Medeiros MH, Di Mascio P (2003) Oxidation of melatonin by singlet molecular oxygen ($O_2(1\Delta g)$) produces N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynurenine. *J Pineal Res* 35:131-137
49. De Backer D, Creteur J, Preiser JC, Dubois MJ, Vincent JL (2002) Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 166:98-104
50. Dobbs BR, Rogers GW, Xing HY, Fraser R (1994) Endotoxin-induced defenestration of the hepatic sinusoidal endothelium: a factor in the pathogenesis of cirrhosis? *Liver* 14:230-233
51. Doolen S, Krause DN, Dubocovich ML, Duckles SP (1998) Melatonin mediates two distinct responses in vascular smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 345:67-69
52. Dubocovich ML, Yun K, Al-Ghoul WM, Benloucif S, Masana MI (1998) Selective MT2 melatonin receptor antagonists block melatonin-mediated phase advances of circadian rhythms. *FASEB J* 12:1211-1220
53. Duncan MJ, Takahashi JS, Dubocovich ML (1988) 2-[125I]iodomelatonin binding sites in hamster brain membranes: pharmacological characteristics and regional distribution. *Endocrinology* 122:1825-1833
54. Dziegiel P, Murawska-Cialowicz E, Jethon Z, Januszewska L, Podhorska-Okolow M, Surowiak P, Zawadzki M, Rabczynski J, Zabel M (2003) Melatonin stimulates the

- activity of protective antioxidative enzymes in myocardial cells of rats in the course of doxorubicin intoxication. *J Pineal Res* 35:183-187
55. Edul VS, Enrico C, Laviolle B, Vazquez AR, Ince C, Dubin A (2012) Quantitative assessment of the microcirculation in healthy volunteers and in patients with septic shock. *Crit Care Med* 40:1443-1448
 56. Ekmekcioglu C, Haslmayer P, Philipp C, Mehrabi MR, Glogar HD, Grimm M, Leibetseder VJ, Thalhammer T, Marktl W (2001a) Expression of the MT1 melatonin receptor subtype in human coronary arteries. *J Recept Signal Transduct Res* 21:85-91
 57. Ekmekcioglu C, Haslmayer P, Philipp C, Mehrabi MR, Glogar HD, Grimm M, Thalhammer T, Marktl W (2001b) 24h variation in the expression of the mt1 melatonin receptor subtype in coronary arteries derived from patients with coronary heart disease. *Chronobiol Int* 18:973-985
 58. Ekmekcioglu C, Thalhammer T, Humpeler S, Mehrabi MR, Glogar HD, Holzenbein T, Markovic O, Leibetseder VJ, Strauss-Blasche G, Marktl W (2003) The melatonin receptor subtype MT2 is present in the human cardiovascular system. *J Pineal Res* 35:40-44
 59. Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG, Brunkhorst R, Gerlach H, Grond S, Gruendling M, Huhle G, Jaschinski U, John S, Mayer K, Oppert M, Olthoff D, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Stuber F, Weiler N, Welte T, Bogatsch H, Hartog C, Loeffler M, Reinhart K (2007) Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med* 33:606-618
 60. Escames G, Lopez LC, Ortiz F, Lopez A, Garcia JA, Ros E, Acuna-Castroviejo D (2007) Attenuation of cardiac mitochondrial dysfunction by melatonin in septic mice. *FEBS J* 274:2135-2147
 61. Esrefoglu M, Gul M, Turan F (2008) Comparative effects of several therapeutic agents on hepatic damage induced by acute experimental pancreatitis. *Dig Dis Sci* 53:1303-1310
 62. Evans BK, Mason R, Wilson VG (1992) Evidence for direct vasoconstrictor activity of melatonin in "pressurized" segments of isolated caudal artery from juvenile rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 346:362-365
 63. Fan HB, Yang DL, Chen AS, Li Z, Xu LT, Ma XJ, Zhou H, Tian ZF, Wu JJ, Yan FM (2013) Sepsis-associated Cholestasis in Adult Patients: A Prospective Study. *Am J Med Sci*
 64. Feder LS, Todaro JA, Laskin DL (1993) Characterization of interleukin-1 and interleukin-6 production by hepatic endothelial cells and macrophages. *J Leukoc Biol* 53:126-132
 65. Ferraiolo BL, Moore JA, Crase D, Gribling P, Wilking H, Baughman RA (1988) Pharmacokinetics and tissue distribution of recombinant human tumor necrosis factor-alpha in mice. *Drug Metab Dispos* 16:270-275
 66. Fink MP, Heard SO (1990) Laboratory models of sepsis and septic shock. *J Surg Res* 49:186-196
 67. Fink T, Glas M, Wolf A, Kleber A, Reus E, Wolff M, Kiefer D, Wolf B, Rensing H, Volk T, Mathes AM (2013a) Melatonin Receptors Mediate Improvements of Survival in a Model of Polymicrobial Sepsis. *Crit Care Med*
 68. Fink T, Heymann P, Taha-Melitz S, Taha A, Wolf B, Rensing H, Volk T, Mathes AM (2013b) Dobutamine pretreatment improves survival, liver function, and hepatic microcirculation after polymicrobial sepsis in rat. *Shock* 40:129-135
 69. Finocchiaro LM, Glikin GC (1998) Intracellular melatonin distribution in cultured cell lines. *J Pineal Res* 24:22-34
 70. Fong YM, Marano MA, Moldawer LL, Wei H, Calvano SE, Kenney JS, Allison AC, Cerami A, Shires GT, Lowry SF (1990) The acute splanchnic and peripheral tissue metabolic response to endotoxin in humans. *J Clin Invest* 85:1896-1904

71. Franca-Botelho AC, Franca JL, Oliveira FM, Franca EL, Honorio-Franca AC, Caliari MV, Gomes MA (2011) Melatonin reduces the severity of experimental amoebiasis. *Parasit Vectors* 4:62
72. Frungieri MB, Mayerhofer A, Zitta K, Pignataro OP, Calandra RS, Gonzalez-Calvar SI (2005) Direct effect of melatonin on Syrian hamster testes: melatonin subtype 1a receptors, inhibition of androgen production, and interaction with the local corticotropin-releasing hormone system. *Endocrinology* 146:1541-1552
73. Fry DE, Pearlstein L, Fulton RL, Polk HC, Jr. (1980) Multiple system organ failure. The role of uncontrolled infection. *Arch Surg* 115:136-140
74. Fujieda H, Hamadanizadeh SA, Wankiewicz E, Pang SF, Brown GM (1999) Expression of mt1 melatonin receptor in rat retina: evidence for multiple cell targets for melatonin. *Neuroscience* 93:793-799
75. Gastel JA, Roseboom PH, Rinaldi PA, Weller JL, Klein DC (1998) Melatonin production: proteasomal proteolysis in serotonin N-acetyltransferase regulation. *Science* 279:1358-1360
76. Gauer F, Masson-Pevet M, Pevet P (1992) Pinealectomy and constant illumination increase the density of melatonin binding sites in the pars tuberalis of rodents. *Brain Res* 575:32-38
77. Gauer F, Masson-Pevet M, Pevet P (1993) Melatonin receptor density is regulated in rat pars tuberalis and suprachiasmatic nuclei by melatonin itself. *Brain Res* 602:153-156
78. Geary GG, Duckles SP, Krause DN (1998) Effect of melatonin in the rat tail artery: role of K⁺ channels and endothelial factors. *Br J Pharmacol* 123:1533-1540
79. Gilad E, Wong HR, Zingarelli B, Virag L, O'Connor M, Salzman AL, Szabo C (1998) Melatonin inhibits expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in murine macrophages: role of inhibition of NFkappaB activation. *FASEB J* 12:685-693
80. Godson C, Reppert SM (1997) The Mel1a melatonin receptor is coupled to parallel signal transduction pathways. *Endocrinology* 138:397-404
81. Goldman BD (2001) Mammalian photoperiodic system: formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement. *J Biol Rhythms* 16:283-301
82. Gomez M, Esparza JL, Nogues MR, Giralt M, Cabre M, Domingo JL (2005) Pro-oxidant activity of aluminum in the rat hippocampus: gene expression of antioxidant enzymes after melatonin administration. *Free Radic Biol Med* 38:104-111
83. Hardeland R (2005) Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine* 27:119-130
84. Hardeland R (2010) Melatonin metabolism in the central nervous system. *Curr Neuropharmacol* 8:168-181
85. Hardeland R, Balzer I, Poeggeler B, Fuhrberg B, Uria H, Behrmann G, Wolf R, Meyer TJ, Reiter RJ (1995) On the primary functions of melatonin in evolution: mediation of photoperiodic signals in a unicell, photooxidation, and scavenging of free radicals. *J Pineal Res* 18:104-111
86. Hardeland R, Poeggeler B, Niebergall R, Zelosko V (2003) Oxidation of melatonin by carbonate radicals and chemiluminescence emitted during pyrrole ring cleavage. *J Pineal Res* 34:17-25
87. Hardeland R, Tan DX, Reiter RJ (2009) Kynuramines, metabolites of melatonin and other indoles: the resurrection of an almost forgotten class of biogenic amines. *J Pineal Res* 47:109-126
88. Hazlerigg DG, Morgan PJ, Lawson W, Hastings MH (1991) Melatonin Inhibits the Activation of Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase in Cultured Pars Tuberalis Cells from Ovine Pituitary. *J Neuroendocrinol* 3:597-603

89. Hill M, McCallum R (1991) Altered transcriptional regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase in rats following endotoxin treatment. *J Clin Invest* 88:811-816
90. Hirata F, Hayaishi O, Tokuyama T, Seno S (1974) In vitro and in vivo formation of two new metabolites of melatonin. *J Biol Chem* 249:1311-1313
91. Holman JM, Jr., Saba TM (1988) Hepatocyte injury during post-operative sepsis: activated neutrophils as potential mediators. *J Leukoc Biol* 43:193-203
92. Horstman JA, Wrona MZ, Dryhurst G (2002) Further insights into the reaction of melatonin with hydroxyl radical. *Bioorg Chem* 30:371-382
93. Hotchkiss RS, Swanson PE, Cobb JP, Jacobson A, Buchman TG, Karl IE (1997) Apoptosis in lymphoid and parenchymal cells during sepsis: findings in normal and T- and B-cell-deficient mice. *Crit Care Med* 25:1298-1307
94. Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, Tinsley KW, Cobb JP, Matuschak GM, Buchman TG, Karl IE (1999) Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med* 27:1230-1251
95. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Grayson MH, Osborne DF, Wagner TH, Cobb JP, Coopersmith C, Karl IE (2002) Depletion of dendritic cells, but not macrophages, in patients with sepsis. *J Immunol* 168:2493-2500
96. Husson I, Mesples B, Bac P, Vamecq J, Evrard P, Gressens P (2002) Melatonergic neuroprotection of the murine periventricular white matter against neonatal excitotoxic challenge. *Ann Neurol* 51:82-92
97. Iskander KN, Osuchowski MF, Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Stepien D, Valentine C, Remick DG (2013) Sepsis: multiple abnormalities, heterogeneous responses, and evolving understanding. *Physiol Rev* 93:1247-1288
98. Itoh MT, Ishizuka B, Kudo Y, Fusama S, Amemiya A, Sumi Y (1997) Detection of melatonin and serotonin N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase activities in rat ovary. *Mol Cell Endocrinol* 136:7-13
99. Janssen BJ, De Celle T, Debets JJ, Brouns AE, Callahan MF, Smith TL (2004) Effects of anesthetics on systemic hemodynamics in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287:H1618-1624
100. Jockers R, Maurice P, Boutin JA, Delagrangé P (2008) Melatonin receptors, heterodimerization, signal transduction and binding sites: what's new? *Br J Pharmacol* 154:1182-1195
101. Jou MJ, Peng TI, Reiter RJ, Jou SB, Wu HY, Wen ST (2004) Visualization of the antioxidative effects of melatonin at the mitochondrial level during oxidative stress-induced apoptosis of rat brain astrocytes. *J Pineal Res* 37:55-70
102. Kato K, Hirai K, Nishiyama K, Uchikawa O, Fukatsu K, Ohkawa S, Kawamata Y, Hinuma S, Miyamoto M (2005) Neurochemical properties of ramelteon (TAK-375), a selective MT1/MT2 receptor agonist. *Neuropharmacology* 48:301-310
103. Katz S, Jimenez MA, Lehmkuhler WE, Grosfeld JL (1991) Liver bacterial clearance following hepatic artery ligation and portacaval shunt. *J Surg Res* 51:267-270
104. Keel M, Ungethum U, Steckholzer U, Niederer E, Hartung T, Trentz O, Ertel W (1997) Interleukin-10 counterregulates proinflammatory cytokine-induced inhibition of neutrophil apoptosis during severe sepsis. *Blood* 90:3356-3363
105. Kim SH, Lee SM (2008) Cytoprotective effects of melatonin against necrosis and apoptosis induced by ischemia/reperfusion injury in rat liver. *J Pineal Res* 44:165-171
106. Kireev R, Bitoun S, Cuesta S, Tejerina A, Ibarrola C, Moreno E, Vara E, Tresguerres JA (2013) Melatonin treatment protects liver of Zucker rats after ischemia/reperfusion by diminishing oxidative stress and apoptosis. *Eur J Pharmacol* 701:185-193
107. Klapproth J, Castell J, Geiger T, Andus T, Heinrich PC (1989) Fate and biological action of human recombinant interleukin 1 beta in the rat in vivo. *Eur J Immunol* 19:1485-1490

108. Kochanek M, Shimabukuro-Vornhagen A, von Bergwelt-Baildon M, Michels G (2012) [Sepsis. Update 2012]. *Dtsch Med Wochenschr* 137:1565-1567
109. Konakchieva R, Kyurkchiev S, Kehayov I, Taushanova P, Kanchev L (1995) Selective effect of methoxyindoles on the lymphocyte proliferation and melatonin binding to activated human lymphoid cells. *J Neuroimmunol* 63:125-132
110. Kramer L, Jordan B, Druml W, Bauer P, Metnitz PG (2007) Incidence and prognosis of early hepatic dysfunction in critically ill patients--a prospective multicenter study. *Crit Care Med* 35:1099-1104
111. Kurus M, Esrefoglu M, Sogutlu G, Atasever A (2009) Melatonin prevents cyclosporine-induced hepatotoxicity in rats. *Med Princ Pract* 18:407-410
112. Lang CH, Bagby GJ, Ferguson JL, Spitzer JJ (1984) Cardiac output and redistribution of organ blood flow in hypermetabolic sepsis. *Am J Physiol* 246:R331-337
113. Lanoix D, Ouellette R, Vaillancourt C (2006) Expression of melatonergic receptors in human placental choriocarcinoma cell lines. *Hum Reprod* 21:1981-1989
114. Lardone PJ, Carrillo-Vico A, Molinero P, Rubio A, Guerrero JM (2009) A novel interplay between membrane and nuclear melatonin receptors in human lymphocytes: significance in IL-2 production. *Cell Mol Life Sci* 66:516-525
115. Laudon M, Nir I, Zisapel N (1988) Melatonin receptors in discrete brain areas of the male rat. Impact of aging on density and on circadian rhythmicity. *Neuroendocrinology* 48:577-583
116. Lutt WW, McQuaker JE (1989) Maintenance of hepatic arterial blood flow during hemorrhage is mediated by adenosine. *Can J Physiol Pharmacol* 67:1023-1028
117. Levy MM, Artigas A, Phillips GS, Rhodes A, Beale R, Osborn T, Vincent JL, Townsend S, Lemeshow S, Dellinger RP (2012) Outcomes of the Surviving Sepsis Campaign in intensive care units in the USA and Europe: a prospective cohort study. *Lancet Infect Dis* 12:919-924
118. Levy MM, Dellinger RP, Townsend SR, Linde-Zwirble WT, Marshall JC, Bion J, Schorr C, Artigas A, Ramsay G, Beale R, Parker MM, Gerlach H, Reinhart K, Silva E, Harvey M, Regan S, Angus DC (2010) The Surviving Sepsis Campaign: results of an international guideline-based performance improvement program targeting severe sepsis. *Intensive Care Med* 36:222-231
119. Lew MJ, Flanders S (1999) Mechanisms of melatonin-induced vasoconstriction in the rat tail artery: a paradigm of weak vasoconstriction. *Br J Pharmacol* 126:1408-1418
120. Li B, Zhang H, Akbar M, Kim HY (2000) Negative regulation of cytosolic phospholipase A(2) by melatonin in the rat pineal gland. *Biochem J* 351 Pt 3:709-716
121. Liang YL, Zhang ZH, Liu XJ, Liu XQ, Tao L, Zhang YF, Wang H, Zhang C, Chen X, Xu DX (2012) Melatonin protects against apoptosis-inducing factor (AIF)-dependent cell death during acetaminophen-induced acute liver failure. *PLoS One* 7:e51911
122. Liaw SJ, Chen JC, Ng CJ, Chiu DF, Chen MF, Chen HM (2002) Beneficial role of melatonin on microcirculation in endotoxin-induced gastropathy in rats: possible implication in nitrogen oxide reduction. *J Formos Med Assoc* 101:129-135
123. Lochner A, Genade S, Davids A, Ytrehus K, Moolman JA (2006) Short- and long-term effects of melatonin on myocardial post-ischemic recovery. *J Pineal Res* 40:56-63
124. Lustig MK, Bac VH, Pavlovic D, Maier S, Grundling M, Grisk O, Wendt M, Heidecke CD, Lehmann C (2007) Colon ascendens stent peritonitis--a model of sepsis adopted to the rat: physiological, microcirculatory and laboratory changes. *Shock* 28:59-64
125. MacKenzie RS, Melan MA, Passey DK, Witt-Enderby PA (2002) Dual coupling of MT(1) and MT(2) melatonin receptors to cyclic AMP and phosphoinositide signal transduction cascades and their regulation following melatonin exposure. *Biochem Pharmacol* 63:587-595

126. Maestroni GJ (1996) Melatonin as a therapeutic agent in experimental endotoxic shock. *J Pineal Res* 20:84-89
127. Mailliet F, Ferry G, Vella F, Berger S, Coge F, Chomarar P, Mallet C, Guenin SP, Guillaumet G, Viaud-Massuard MC, Yous S, Delagrangé P, Boutin JA (2005) Characterization of the melatonergic MT₃ binding site on the NRH:quinone oxidoreductase 2 enzyme. *Biochem Pharmacol* 71:74-88
128. Mailliet F, Ferry G, Vella F, Thiam K, Delagrangé P, Boutin JA (2004) Organs from mice deleted for NRH:quinone oxidoreductase 2 are deprived of the melatonin binding site MT₃. *FEBS Lett* 578:116-120
129. Mallick AA, Ishizaka A, Stephens KE, Hatherill JR, Tazelaar HD, Raffin TA (1989) Multiple organ damage caused by tumor necrosis factor and prevented by prior neutrophil depletion. *Chest* 95:1114-1120
130. Marx G, Albers J, Bauer M, Eikermann M, Gnass I, Hobohm C, Janssens U, Kluge S, Kranke P, Maurer T, Merz W, Mosch C, Neugebauer E, Quintel M, Schindler AW, Senninger N, Trampisch H-J, Waydhas C, Wildenauer R, Zacharowski K (2014). S3-Leitlinie Intravasale Volumentherapie beim Erwachsenen (Deutsche Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin)
131. Masana MI, Doolen S, Ersahin C, Al-Ghoul WM, Duckles SP, Dubocovich ML, Krause DN (2002) MT₂ melatonin receptors are present and functional in rat caudal artery. *J Pharmacol Exp Ther* 302:1295-1302
132. Mathes AM, Kubulus D, Pradarutti S, Bentley A, Weiler J, Wolf B, Ziegeler S, Bauer I, Rensing H (2008a) Melatonin pretreatment improves liver function and hepatic perfusion after hemorrhagic shock. *Shock* 29:112-118
133. Mathes AM, Kubulus D, Waibel L, Weiler J, Heymann P, Wolf B, Rensing H (2008b) Selective activation of melatonin receptors with ramelteon improves liver function and hepatic perfusion after hemorrhagic shock in rat. *Crit Care Med* 36:2863-2870
134. Mathes AM, Kubulus D, Weiler J, Bentley A, Waibel L, Wolf B, Bauer I, Rensing H (2008c) Melatonin receptors mediate improvements of liver function but not of hepatic perfusion and integrity after hemorrhagic shock in rats. *Crit Care Med* 36:24-29
135. Mathes AM, Wolf B, Rensing H (2008d) Melatonin receptor antagonist luzindole is a powerful radical scavenger in vitro. *J Pineal Res* 45:337-338
136. Mathison JC, Ulevitch RJ (1979) The clearance, tissue distribution, and cellular localization of intravenously injected lipopolysaccharide in rabbits. *J Immunol* 123:2133-2143
137. Mattson DL (2001) Comparison of arterial blood pressure in different strains of mice. *Am J Hypertens* 14:405-408
138. Mayo JC, Sainz RM, Antoli I, Herrera F, Martin V, Rodriguez C (2002) Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expression. *Cell Mol Life Sci* 59:1706-1713
139. Mazzucchelli C, Pannacci M, Nonno R, Lucini V, Fraschini F, Stankov BM (1996) The melatonin receptor in the human brain: cloning experiments and distribution studies. *Brain Res Mol Brain Res* 39:117-126
140. McArthur AJ, Hunt AE, Gillette MU (1997) Melatonin action and signal transduction in the rat suprachiasmatic circadian clock: activation of protein kinase C at dusk and dawn. *Endocrinology* 138:627-634
141. McCurdy TR, Patrick AL, Eltringham-Smith LJ, Bhakta V, Sheffield WP, Fox-Robichaud AE (2014) Alpha-1 acid glycoprotein reduces hepatic leukocyte recruitment in murine models of either early endotoxemia or early sepsis. *Microcirculation* 21:74-83
142. McGechan A, Wellington K (2005) Ramelteon. *CNS Drugs* 19:1057-1065; discussion 1066-1057

143. McNulty S, Ross AW, Barrett P, Hastings MH, Morgan PJ (1994) Melatonin regulates the phosphorylation of CREB in ovine pars tuberalis. *J Neuroendocrinol* 6:523-532
144. Mei YA, Lee PP, Wei H, Zhang ZH, Pang SF (2001) Melatonin and its analogs potentiate the nifedipine-sensitive high-voltage-activated calcium current in the chick embryonic heart cells. *J Pineal Res* 30:13-21
145. Menendez-Pelaez A, Howes KA, Gonzalez-Brito A, Reiter RJ (1987) N-acetyltransferase activity, hydroxyindole-O-methyltransferase activity, and melatonin levels in the Harderian glands of the female Syrian hamster: changes during the light:dark cycle and the effect of 6-parachlorophenylalanine administration. *Biochem Biophys Res Commun* 145:1231-1238
146. Morrey KM, McLachlan JA, Serkin CD, Bakouche O (1994) Activation of human monocytes by the pineal hormone melatonin. *J Immunol* 153:2671-2680
147. Muhlbauer E, Peschke E (2007) Evidence for the expression of both the MT1- and in addition, the MT2-melatonin receptor, in the rat pancreas, islet and beta-cell. *J Pineal Res* 42:105-106
148. Muller CM, Scierka A, Stiller RL, Kim YM, Cook DR, Lancaster JR, Jr., Buffington CW, Watkins WD (1996) Nitric oxide mediates hepatic cytochrome P450 dysfunction induced by endotoxin. *Anesthesiology* 84:1435-1442
149. Munoz-Casares FC, Padillo FJ, Briceno J, Collado JA, Munoz-Castaneda JR, Ortega R, Cruz A, Tunez I, Montilla P, Pera C, Muntane J (2006) Melatonin reduces apoptosis and necrosis induced by ischemia/reperfusion injury of the pancreas. *J Pineal Res* 40:195-203
150. Musshoff U, Riewenherm D, Berger E, Fauteck JD, Speckmann EJ (2002) Melatonin receptors in rat hippocampus: molecular and functional investigations. *Hippocampus* 12:165-173
151. Naidu PS, Singh A, Kaur P, Sandhir R, Kulkarni SK (2003) Possible mechanism of action in melatonin attenuation of haloperidol-induced orofacial dyskinesia. *Pharmacol Biochem Behav* 74:641-648
152. Naji L, Carrillo-Vico A, Guerrero JM, Calvo JR (2004) Expression of membrane and nuclear melatonin receptors in mouse peripheral organs. *Life Sci* 74:2227-2236
153. Navaratnam RL, Morris SE, Traber DL, Flynn J, Woodson L, Linares H, Herndon DN (1990) Endotoxin (LPS) increases mesenteric vascular resistance (MVR) and bacterial translocation (BT). *J Trauma* 30:1104-1113; discussion 1113-1105
154. Nelson CS, Ikeda M, Gompf HS, Robinson ML, Fuchs NK, Yoshioka T, Neve KA, Allen CN (2001) Regulation of melatonin 1a receptor signaling and trafficking by asparagine-124. *Mol Endocrinol* 15:1306-1317
155. New DC, Tsim ST, Wong YH (2003) G protein-linked effector and second messenger systems involved in melatonin signal transduction. *Neurosignals* 12:59-70
156. Nosjean O, Ferro M, Coge F, Beauverger P, Henlin JM, Lefoulon F, Fauchere JL, Delagrang P, Canet E, Boutin JA (2000) Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J Biol Chem* 275:31311-31317
157. Nosjean O, Nicolas JP, Klupsch F, Delagrang P, Canet E, Boutin JA (2001) Comparative pharmacological studies of melatonin receptors: MT1, MT2 and MT3/QR2. Tissue distribution of MT3/QR2. *Biochem Pharmacol* 61:1369-1379
158. Pablos MI, Reiter RJ, Ortiz GG, Guerrero JM, Agapito MT, Chuang JI, Sewerynek E (1998) Rhythms of glutathione peroxidase and glutathione reductase in brain of chick and their inhibition by light. *Neurochem Int* 32:69-75
159. Pan M, Song YL, Xu JM, Gan HZ (2006) Melatonin ameliorates nonalcoholic fatty liver induced by high-fat diet in rats. *J Pineal Res* 41:79-84
160. Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Spence DW, Moscovitch A, Hardeland R, Brown GM, Cardinali DP (2009) Ramelteon: a review of its therapeutic potential in sleep disorders. *Adv Ther* 26:613-626

161. Petit L, Lacroix I, de Coppet P, Strosberg AD, Jockers R (1999) Differential signaling of human Mel1a and Mel1b melatonin receptors through the cyclic guanosine 3'-5'-monophosphate pathway. *Biochem Pharmacol* 58:633-639
162. Peyrot F, Martin MT, Migault J, Ducrocq C (2003) Reactivity of peroxyxynitrite with melatonin as a function of pH and CO₂ content. *European Journal of Organic Chemistry*:172-181
163. Pintor J, Martin L, Pelaez T, Hoyle CH, Peral A (2001) Involvement of melatonin MT(3) receptors in the regulation of intraocular pressure in rabbits. *Eur J Pharmacol* 416:251-254
164. Pozo D, Garcia-Maurino S, Guerrero JM, Calvo JR (2004) mRNA expression of nuclear receptor RZR/RORalpha, melatonin membrane receptor MT, and hydroxyindole-O-methyltransferase in different populations of human immune cells. *J Pineal Res* 37:48-54
165. Pozo D, Reiter RJ, Calvo JR, Guerrero JM (1994) Physiological concentrations of melatonin inhibit nitric oxide synthase in rat cerebellum. *Life Sci* 55:PL455-460
166. Prada C, Udin SB, Wiechmann AF, Zhdanova IV (2005) Stimulation of melatonin receptors decreases calcium levels in xenopus tectal cells by activating GABA(C) receptors. *J Neurophysiol* 94:968-978
167. Rafii-El-Idrissi M, Calvo JR, Harmouch A, Garcia-Maurino S, Guerrero JM (1998) Specific binding of melatonin by purified cell nuclei from spleen and thymus of the rat. *J Neuroimmunol* 86:190-197
168. Regrigny O, Delagrangé P, Scalbert E, Lartaud-Idjouadiene I, Atkinson J, Chillon JM (1999) Effects of melatonin on rat pial arteriolar diameter in vivo. *Br J Pharmacol* 127:1666-1670
169. Reinhart K, Brunkhorst FM, Bone HG, Bardutzky J, Dempfle CE, Forst H, Gastmeier P, Gerlach H, Grundling M, John S, Kern W, Kreymann G, Kruger W, Kujath P, Marggraf G, Martin J, Mayer K, Meier-Hellmann A, Oppert M, Putensen C, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Seifert H, Spies C, Stuber F, Weiler N, Weimann A, Werdan K, Welte T (2010) [Prevention, diagnosis, treatment, and follow-up care of sepsis. First revision of the S2k Guidelines of the German Sepsis Society (DSG) and the German Interdisciplinary Association for Intensive and Emergency Care Medicine (DIVI)]. *Anaesthesist* 59:347-370
170. Reppert SM, Godson C, Mahle CD, Weaver DR, Slaugenhaupt SA, Gusella JF (1995) Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:8734-8738
171. Reppert SM, Weaver DR (2002) Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 418:935-941
172. Reppert SM, Weaver DR, Ebisawa T (1994) Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron* 13:1177-1185
173. Requentina PJ, Oxenkrug GF (2007) Effect of luzindole and other melatonin receptor antagonists on iron- and lipopolysaccharide-induced lipid peroxidation in vitro. *Ann N Y Acad Sci* 1122:289-294
174. Ressmeyer AR, Mayo JC, Zelosko V, Sainz RM, Tan DX, Poeggeler B, Antolin I, Zsizsik BK, Reiter RJ, Hardeland R (2003) Antioxidant properties of the melatonin metabolite N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK): scavenging of free radicals and prevention of protein destruction. *Redox Rep* 8:205-213
175. Rezzani R, Rodella LF, Bonomini F, Tengattini S, Bianchi R, Reiter RJ (2006) Beneficial effects of melatonin in protecting against cyclosporine A-induced cardiotoxicity are receptor mediated. *J Pineal Res* 41:288-295

176. Roelofsen H, van der Veere CN, Ottenhoff R, Schoemaker B, Jansen PL, Oude Elferink RP (1994) Decreased bilirubin transport in the perfused liver of endotoxemic rats. *Gastroenterology* 107:1075-1084
177. Rooney JC, Hill DJ, Danks DM (1971) Jaundice associated with bacterial infection in the newborn. *Am J Dis Child* 122:39-41
178. Russell JA, Boyd J, Nakada T, Thair S, Walley KR (2011) Molecular mechanisms of sepsis. *Contrib Microbiol* 17:48-85
179. Sainz RM, Mayo JC, Uria H, Kotler M, Antolin I, Rodriguez C, Menendez-Pelaez A (1995) The pineal neurohormone melatonin prevents in vivo and in vitro apoptosis in thymocytes. *J Pineal Res* 19:178-188
180. Sakr Y, Dubois MJ, De Backer D, Creteur J, Vincent JL (2004) Persistent microcirculatory alterations are associated with organ failure and death in patients with septic shock. *Crit Care Med* 32:1825-1831
181. Sallinen P, Saarela S, Ilves M, Vakkuri O, Leppaluoto J (2005) The expression of MT1 and MT2 melatonin receptor mRNA in several rat tissues. *Life Sci* 76:1123-1134
182. Satake N, Oe H, Shibata S (1991) Vasorelaxing action of melatonin in rat isolated aorta; possible endothelium dependent relaxation. *Gen Pharmacol* 22:1127-1133
183. Schaefer M, Hardeland R (2009) The melatonin metabolite N-acetyl-5-methoxykynuramine is a potent singlet oxygen scavenger. *J Pineal Res* 46:49-52
184. Scheiermann P, Hoegl S, Revermann M, Ahluwalia D, Zander J, Boost KA, Nguyen T, Zwissler B, Muhl H, Hofstetter C (2009) Cecal ligation and incision: an acute onset model of severe sepsis in rats. *J Surg Res* 151:132-137
185. Schlabritz-Loutsevitch N, Hellner N, Middendorf R, Muller D, Olcese J (2003) The human myometrium as a target for melatonin. *J Clin Endocrinol Metab* 88:908-913
186. Schmidt HB, Werdan K, Muller-Werdan U (2001) Autonomic dysfunction in the ICU patient. *Curr Opin Crit Care* 7:314-322
187. Schomerus C, Korf HW (2005) Mechanisms regulating melatonin synthesis in the mammalian pineal organ. *Ann N Y Acad Sci* 1057:372-383
188. Schuster C, Gauer F, Malan A, Recio J, Pevet P, Masson-Pevet M (2001) The circadian clock, light/dark cycle and melatonin are differentially involved in the expression of daily and photoperiodic variations in mt(1) melatonin receptors in the Siberian and Syrian hamsters. *Neuroendocrinology* 74:55-68
189. Seever K, Hardeland R (2008) Novel pathway for N1-acetyl-5-methoxykynuramine: UVB-induced liberation of carbon monoxide from precursor N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine. *J Pineal Res* 44:450-455
190. Semak I, Naumova M, Korik E, Terekhovich V, Wortsman J, Slominski A (2005) A novel metabolic pathway of melatonin: oxidation by cytochrome C. *Biochemistry* 44:9300-9307
191. Sener G, Toklu H, Kapucu C, Ercan F, Erkanli G, Kacmaz A, Tilki M, Yegen BC (2005) Melatonin protects against oxidative organ injury in a rat model of sepsis. *Surg Today* 35:52-59
192. Seok J, Warren HS, Cuenca AG, Mindrinos MN, Baker HV, Xu W, Richards DR, McDonald-Smith GP, Gao H, Hennessy L, Finnerty CC, Lopez CM, Honari S, Moore EE, Minei JP, Cuschieri J, Bankey PE, Johnson JL, Sperry J, Nathens AB, Billiar TR, West MA, Jeschke MG, Klein MB, Gamelli RL, Gibran NS, Brownstein BH, Miller-Graziano C, Calvano SE, Mason PH, Cobb JP, Rahme LG, Lowry SF, Maier RV, Moldawer LL, Herndon DN, Davis RW, Xiao W, Tompkins RG (2013) Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:3507-3512
193. Sewerynek E, Abe M, Reiter RJ, Barlow-Walden LR, Chen L, McCabe TJ, Roman LJ, Diaz-Lopez B (1995a) Melatonin administration prevents lipopolysaccharide-induced oxidative damage in phenobarbital-treated animals. *J Cell Biochem* 58:436-444

194. Sewerynek E, Melchiorri D, Reiter RJ, Ortiz GG, Lewinski A (1995b) Lipopolysaccharide-induced hepatotoxicity is inhibited by the antioxidant melatonin. *Eur J Pharmacol* 293:327-334
195. Shang Y, Xu SP, Wu Y, Jiang YX, Wu ZY, Yuan SY, Yao SL (2009) Melatonin reduces acute lung injury in endotoxemic rats. *Chin Med J (Engl)* 122:1388-1393
196. Shen YX, Xu SY, Wei W, Sun XX, Yang J, Liu LH, Dong C (2002a) Melatonin reduces memory changes and neural oxidative damage in mice treated with D-galactose. *J Pineal Res* 32:173-178
197. Shen YX, Xu SY, Wei W, Wang XL, Wang H, Sun X (2002b) Melatonin blocks rat hippocampal neuronal apoptosis induced by amyloid beta-peptide 25-35. *J Pineal Res* 32:163-167
198. Silva SO, Ximenes VF, Catalani LH, Campa A (2000) Myeloperoxidase-catalyzed oxidation of melatonin by activated neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 279:657-662
199. Slominski A, Pisarchik A, Semak I, Sweatman T, Wortsman J, Szczesniewski A, Slugocki G, McNulty J, Kauser S, Tobin DJ, Jing C, Johansson O (2002) Serotonergic and melatonergic systems are fully expressed in human skin. *FASEB J* 16:896-898
200. Slominski A, Pisarchik A, Zbytek B, Tobin DJ, Kauser S, Wortsman J (2003) Functional activity of serotonergic and melatonergic systems expressed in the skin. *J Cell Physiol* 196:144-153
201. Spanos A, Jhanji S, Vivian-Smith A, Harris T, Pearse RM (2010) Early microvascular changes in sepsis and severe sepsis. *Shock* 33:387-391
202. Steinhilber D, Brungs M, Werz O, Wiesenberg I, Danielsson C, Kahlen JP, Nayeri S, Schrader M, Carlberg C (1995) The nuclear receptor for melatonin represses 5-lipoxygenase gene expression in human B lymphocytes. *J Biol Chem* 270:7037-7040
203. Strassburg CP (2003) Gastrointestinal disorders of the critically ill. Shock liver. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 17:369-381
204. Szabo C, Day BJ, Salzman AL (1996) Evaluation of the relative contribution of nitric oxide and peroxynitrite to the suppression of mitochondrial respiration in immunostimulated macrophages using a manganese mesoporphyrin superoxide dismutase mimetic and peroxynitrite scavenger. *FEBS Lett* 381:82-86
205. Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Plummer BF, Hardies LJ, Weintraub ST, Vijayalaxmi, Shepherd AM (1998) A novel melatonin metabolite, cyclic 3-hydroxymelatonin: a biomarker of in vivo hydroxyl radical generation. *Biochem Biophys Res Commun* 253:614-620
206. Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Plummer BF, Limson J, Weintraub ST, Qi W (2000) Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: a potentially new metabolic pathway of melatonin biotransformation. *Free Radic Biol Med* 29:1177-1185
207. Tapias V, Escames G, Lopez LC, Lopez A, Camacho E, Carrion MD, Entrena A, Gallo MA, Espinosa A, Acuna-Castroviejo D (2009) Melatonin and its brain metabolite N(1)-acetyl-5-methoxykynuramine prevent mitochondrial nitric oxide synthase induction in parkinsonian mice. *J Neurosci Res* 87:3002-3010
208. Tijmes M, Pedraza R, Valladares L (1996) Melatonin in the rat testis: evidence for local synthesis. *Steroids* 61:65-68
209. Ting KN, Dunn WR, Davies DJ, Sugden D, Delagrangre P, Guardiola-Lemaitre B, Scalbert E, Wilson VG (1997) Studies on the vasoconstrictor action of melatonin and putative melatonin receptor ligands in the tail artery of juvenile Wistar rats. *Br J Pharmacol* 122:1299-1306
210. Titheradge MA (1999) Nitric oxide in septic shock. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1411:437-455

211. Torres-Farfan C, Richter HG, Rojas-Garcia P, Vergara M, Forcelledo ML, Valladares LE, Torrealba F, Valenzuela GJ, Seron-Ferre M (2003) mt1 Melatonin receptor in the primate adrenal gland: inhibition of adrenocorticotropin-stimulated cortisol production by melatonin. *J Clin Endocrinol Metab* 88:450-458
212. Tosini G, Menaker M (1998) The clock in the mouse retina: melatonin synthesis and photoreceptor degeneration. *Brain Res* 789:221-228
213. Traeger T, Mikulcak M, Eipel C, Abshagen K, Diedrich S, Heidecke CD, Maier S, Vollmar B (2010) Kupffer cell depletion reduces hepatic inflammation and apoptosis but decreases survival in abdominal sepsis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 22:1039-1049
214. Trzeciak S, Dellinger RP, Parrillo JE, Guglielmi M, Bajaj J, Abate NL, Arnold RC, Colilla S, Zanotti S, Hollenberg SM (2007) Early microcirculatory perfusion derangements in patients with severe sepsis and septic shock: relationship to hemodynamics, oxygen transport, and survival. *Ann Emerg Med* 49:88-98, 98 e81-82
215. Tunstall RR, Shukla P, Grazul-Bilska A, Sun C, O'Rourke ST (2011) MT2 receptors mediate the inhibitory effects of melatonin on nitric oxide-induced relaxation of porcine isolated coronary arteries. *J Pharmacol Exp Ther* 336:127-133
216. Uz T, Arslan AD, Kurtuncu M, Imbesi M, Akhisaroglu M, Dwivedi Y, Pandey GN, Manev H (2005) The regional and cellular expression profile of the melatonin receptor MT1 in the central dopaminergic system. *Brain Res Mol Brain Res* 136:45-53
217. Vacas MI, Cardinali DP (1979) Diurnal changes in melatonin binding sites of hamster and rat brains. Correlations with neuroendocrine responsiveness to melatonin. *Neurosci Lett* 15:259-263
218. Vacas MI, Del Zar MM, Martinuzzo M, Cardinali DP (1992) Binding sites for [3H]-melatonin in human platelets. *J Pineal Res* 13:60-65
219. Wang H, Xu DX, Lv JW, Ning H, Wei W (2007) Melatonin attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced apoptotic liver damage in D-galactosamine-sensitized mice. *Toxicology* 237:49-57
220. Wang P, Ba ZF, Chaudry IH (1991) Hepatic extraction of indocyanine green is depressed early in sepsis despite increased hepatic blood flow and cardiac output. *Arch Surg* 126:219-224
221. Wang P, Chaudry IH (1996) Mechanism of hepatocellular dysfunction during hyperdynamic sepsis. *Am J Physiol* 270:R927-938
222. Wang P, Zhou M, Rana MW, Ba ZF, Chaudry IH (1992) Differential alterations in microvascular perfusion in various organs during early and late sepsis. *Am J Physiol* 263:G38-43
223. Wang WZ, Fang XH, Stephenson LL, Baynosa RC, Khiabani KT, Zamboni WA (2005) Microcirculatory effects of melatonin in rat skeletal muscle after prolonged ischemia. *J Pineal Res* 39:57-65
224. Weaver DR, Reppert SM (1996) The Mel1a melatonin receptor gene is expressed in human suprachiasmatic nuclei. *Neuroreport* 8:109-112
225. Weekley LB (1991) Melatonin-induced relaxation of rat aorta: interaction with adrenergic agonists. *J Pineal Res* 11:28-34
226. Wichmann MW, Haisken JM, Ayala A, Chaudry IH (1996) Melatonin administration following hemorrhagic shock decreases mortality from subsequent septic challenge. *J Surg Res* 65:109-114
227. Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH (1980) Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res* 29:189-201
228. Wiesenberg I, Missbach M, Kahlen JP, Schrader M, Carlberg C (1995) Transcriptional activation of the nuclear receptor RZR alpha by the pineal gland hormone melatonin and identification of CGP 52608 as a synthetic ligand. *Nucleic Acids Res* 23:327-333

229. Wu CC, Chiao CW, Hsiao G, Chen A, Yen MH (2001) Melatonin prevents endotoxin-induced circulatory failure in rats. *J Pineal Res* 30:147-156
230. Wu JY, Tsou MY, Chen TH, Chen SJ, Tsao CM, Wu CC (2008) Therapeutic effects of melatonin on peritonitis-induced septic shock with multiple organ dysfunction syndrome in rats. *J Pineal Res* 45:106-116
231. Young IM, Leone RM, Francis P, Stovell P, Silman RE (1985) Melatonin is metabolized to N-acetyl serotonin and 6-hydroxymelatonin in man. *J Clin Endocrinol Metab* 60:114-119
232. Yu Q, Miller SC, Osmond DG (2000) Melatonin inhibits apoptosis during early B-cell development in mouse bone marrow. *J Pineal Res* 29:86-93
233. Zell R, Geck P, Werdan K, Boekstegers P (1997) TNF-alpha and IL-1 alpha inhibit both pyruvate dehydrogenase activity and mitochondrial function in cardiomyocytes: evidence for primary impairment of mitochondrial function. *Mol Cell Biochem* 177:61-67
234. Zhang H, Akbar M, Kim HY (1999a) Melatonin: an endogenous negative modulator of 12-lipoxygenation in the rat pineal gland. *Biochem J* 344 Pt 2:487-493
235. Zhang H, Squadrito GL, Uppu R, Pryor WA (1999b) Reaction of peroxynitrite with melatonin: A mechanistic study. *Chem Res Toxicol* 12:526-534
236. Zhao WJ, Zhang M, Miao Y, Yang XL, Wang Z (2010) Melatonin potentiates glycine currents through a PLC/PKC signalling pathway in rat retinal ganglion cells. *J Physiol* 588:2605-2619
237. Zimmerhackl B, Parekh N, Brinkhus H, Steinhausen M (1983) The use of fluorescent labeled erythrocytes for intravital investigation of flow and local hematocrit in glomerular capillaries in the rat. *Int J Microcirc Clin Exp* 2:119-129
238. Zisapel N, Shaharabani M, Laudon M (1987) Regulation of melatonin's activity in the female rat brain by estradiol: effects on neurotransmitter release and on iodomelatonin binding sites. *Neuroendocrinology* 46:207-216

8 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich ganz herzlich den Personen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. med. Volk danke ich für die Ermöglichung der Durchführung dieser Arbeit in seiner Abteilung für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie des Universitätsklinikums des Saarlandes, Homburg/Saar.

Priv.-Doz. Dr. Alexander Mathes (ehemals Abteilung für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie des Universitätsklinikums des Saarlandes, derzeit Universitätsklinikum Köln) danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und die hilfreichen wissenschaftlichen Anregungen.

Mein besonderer Dank gilt Priv.-Doz. Dr. med. Tobias Fink für die Einarbeitung in die Thematik, seine hervorragende menschliche und wissenschaftliche Betreuung und die intensive Korrektur der Arbeit, die entscheidend zum Gelingen beitrugen.

Frau Dr. rer. nat. Astrid Kleber und Dr. med. Michael Glas danke ich für die Unterstützung dieser Arbeit und bei der Durchführung der Versuche im Tierlabor.

Frau Beate Wolf danke ich für die Unterstützung bei laborchemischen Analysen.

Meinen Mitdoktoranden Sebastian Ruf, Nadine Hempel und Dr. med. Daniel Kiefer danke ich für die gute Zusammenarbeit und Zuverlässigkeit bei der gemeinsamen Arbeit im Tierlabor.

Des Weiteren danke ich ganz herzlich Dr. med. Manuel Marco Fritsch und Dr. Mitchell Lloyd für deren Unterstützung bei der englischen Übersetzung.

Zum Abschluss danke ich meiner Familie und meinen Freunden, die mich während der Arbeit an diesem Thema motiviert und unterstützt haben. Insbesondere gilt der Dank meinen Eltern, ohne deren Unterstützung diese Promotion nicht möglich gewesen wäre.